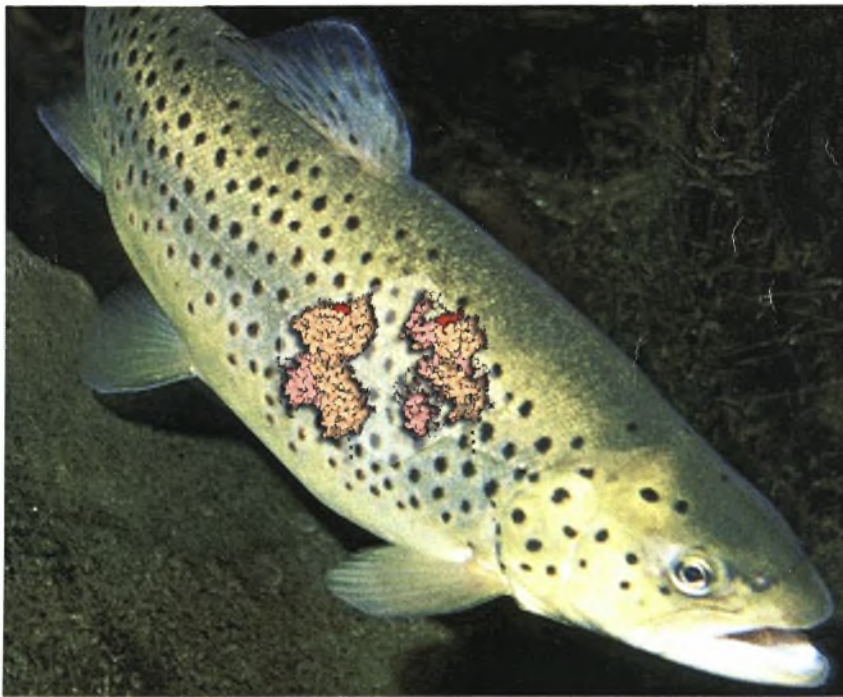




**Μοριακή ανάλυση του Μείζονος Συμπλέγματος  
Ιστοσυμβατότητας (MHC) στην πέστροφα  
(*Salmo trutta*)**



**Διπλωματική Εργασία  
Θεμιστοκλής Γιαννούλης**

**Σεπτέμβριος 2007**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 5900/1  
Ημερ. Εισ.: 11-03-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2007  
ΓΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087354

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη.

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν με το δικό τους τρόπο στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Τον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου αναθέτοντάς μου ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον ερευνητικό έργο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Αικατερίνη Μούτου για τη συμβολή της στην πραγματοποίηση των πειραμάτων. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας και ιδιαίτερα τους υποψήφιους Διδάκτορες, Κώστα Σταμάτη και Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη, και την ερευνητική συνεργάτιδα, Θεολογία Σαραφίδου, για την πολύτιμη βοήθεια και το φιλικό κλίμα συνεργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας του ΑΠΘ, κ. Αποστολίδη Απόστολο, για την παροχή των δειγμάτων στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες.*

#### Τριμελής επιτροπή:

1. Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Αικατερίνη Μούτου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	5
Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC).....	6
Εξέλιξη του MHC.....	10
Το MHC των ιχθύων.....	11
Επιλογή στο MHC.....	14
MHC & Επιλογή συντρόφου.....	15
Ποικιλομορφία του MHC.....	17
Είδος – <i>Salmo trutta</i> .....	20
Συστηματική κατάταξη.....	20
Περιοχές διαβίωσης.....	20
Κατοικία.....	21
Φυσική περιγραφή.....	22
Αναπαραγωγή.....	23
Γονιμότητα και επιβίωση.....	24
Διατροφικές συνήθειες.....	24
Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο.....	24
Ασθένειες.....	25
Κίνδυνοι.....	26
Ανάλυση SSCP.....	26
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	28
Υλικά.....	29
Μέθοδοι.....	30
Δείγματα.....	30
Απομόνωση του DNA.....	30
Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανα δείγμα.....	34
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	34
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη.....	36
Ανάλυση SSCP ( <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> ).....	37
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	41
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	49
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	56

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 19ο αιώνα οι πρώτοι που συνέλαβαν την ιδέα της εξέλιξης ήταν οι Charles Darwin και Alfred Wallace. Σύμφωνα με τους δύο αυτούς μελετητές οι μικροδιαφορές μεταξύ ατόμων ενός είδους δεν είναι ατέλειες αλλά αντίθετα αποτελούν το υλικό με το οποίο η φυσική επιλογή πλάθει νέες μορφές ζωής. Οι μικροδιαφορές αυτές για πολλές δεκαετίες μελετούνταν μόνο σε επίπεδο μορφολογικών και ηθολογικών χαρακτηριστικών. Σήμερα, η ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών παρέχει τη δυνατότητα μελέτης της ποικιλομορφίας μέχρι και σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Οι αναλύσεις αυτές επιτρέπουν την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων για την ενδοειδική και τη διαειδική ποικιλομορφία.

Η πληθώρα τόσο των μοριακών δεικτών όσο και των μοριακών τεχνικών επιτρέπουν την επιλογή διαφορετικών συνδυασμών μεταξύ αυτών των δύο για την ανάλυση των πολυμορφισμών, ανάλογα βέβαια κάθε φορά με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του υπό μελέτη είδους.

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν οι πολυμορφισμοί δυο γονιδίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), του 2<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου UAA(MHC class I) καθώς και του 2<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου DAB (MHC class II), του οργανισμού *Salmo trutta* με την χρήση της μεθόδου του SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism).

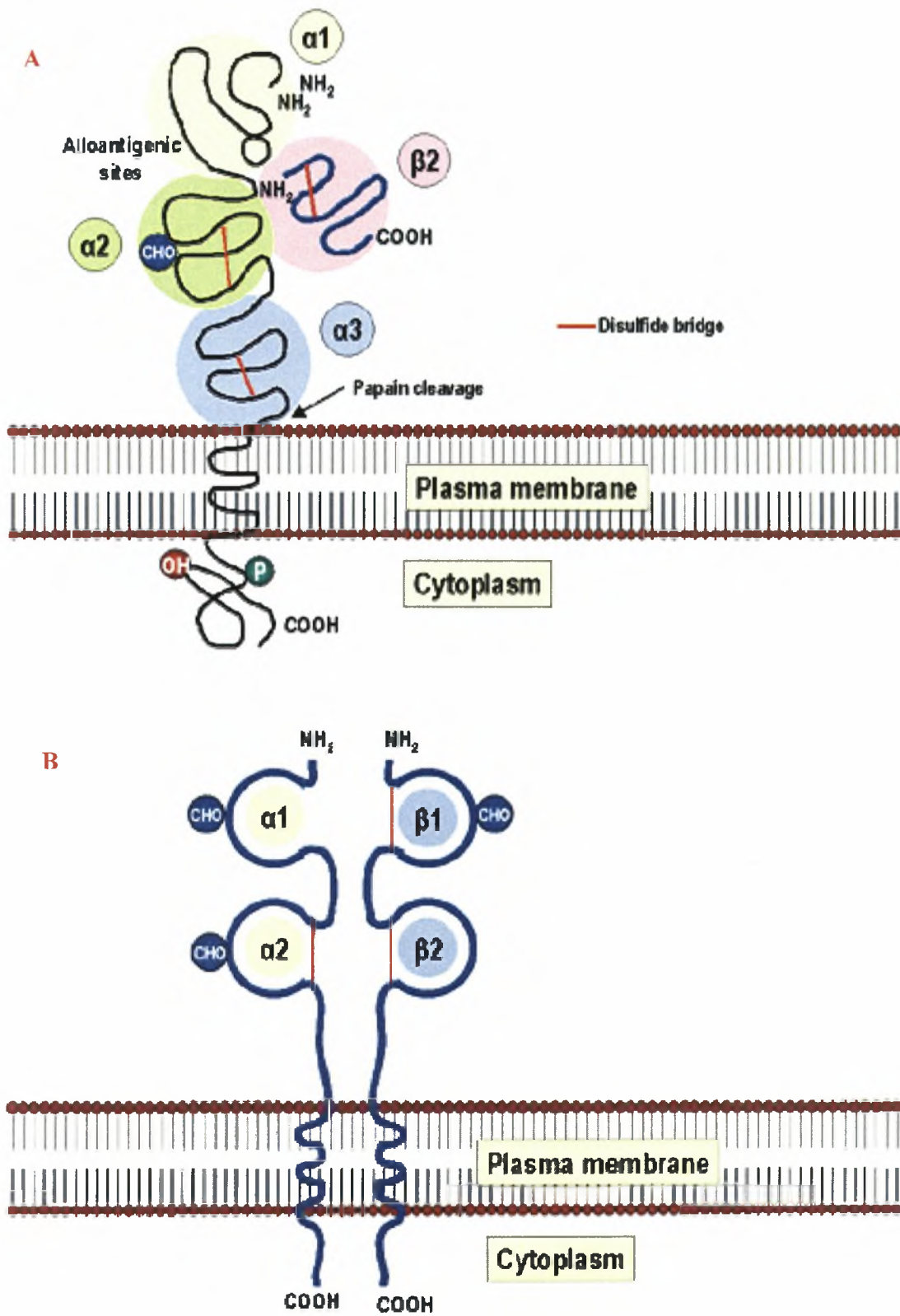
### **Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC)**

Το MHC ανακαλύφθηκε σαν ο γενετικός τόπος που καθόριζε κατά κύριο λόγο την αποδοχή ή την απόρριψη των μοσχευμάτων από ένα άτομο σε ένα άλλο. Ανακαλύφθηκε σε μελέτες μεταμόσχευσης σε ποντίκια από τον Peter Issac Gorer στο Lister Institute του Λονδίνου το 1937. Καθώς ,όμως, η απόρριψη ενός μοσχεύματος δεν είναι ένα φυσικό

βιολογικό φαινόμενο, ποια είναι η φυσιολογική λειτουργία των μορίων του MHC; Σήμερα, είναι γνωστό ότι η κύρια φυσιολογική λειτουργία των μορίων του MHC είναι η παρουσίαση πεπτιδίων από πρωτεϊνικά αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα.

Οι γονιδιακοί τόποι του MHC κωδικοποιούν για μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που καθιστούν δυνατή την αναγνώριση των εαυτών και ξένων αντιγόνων από τα T λεμφοκύτταρα. (Klein, 1986 ) Υπάρχουν δυο κύριες τάξεις μορίων MHC, που αναφέρονται ως τάξη I και τάξη II, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη δομή, την εξειδίκευση δέσμευσης πεπτιδίων και τον τύπο των T κυττάρων που ενεργοποιούν. (Rothbard and Geftter, 1991). Τα μόρια MHC τάξης I και II είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες η καθεμία από τις οποίες περιέχει μια αύλακα σύνδεσης του πεπτιδίου στο αμινοτελικό άκρο της. Κάθε μόριο τάξης I αποτελείται από μια α αλυσίδα, μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη σε μια πρωτεΐνη, την β-μικροσφαιρίνη.( Grimholt et al, 2003) Τα μόρια του MHC τάξης I εκφράζονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα. Τα αμινοτελικά τμήματα α1 και α2 του μορίου MHC τάξης I σχηματίζουν μια αύλακα σύνδεσης του πεπτιδίου, η οποία είναι αρκετά μεγάλη ώστε να εφαρμόζουν πεπτίδια 8-11 αμινοξέων (**Εικόνα 1A**). Τα μόρια MHC τάξης II είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από τις αλυσίδες α και β (**Εικόνα 1B**). (McConnell et al,1998) Εκφράζονται κυρίως στα επαγγελματικά αντιγονοπαρασυστασιακά κύτταρα, δηλαδή στα μακροφάγα, τα B κύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Οι περιοχές α1 και β1 σχηματίζουν την περιοχή δέσμευσης του πεπτιδίου στην οποία δεσμεύονται τα πεπτίδια και αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς των CD4+ T βοηθητικών κυττάρων.





Εικόνα 1: Α. Μόριο MHC τάξης I. Β. Μόριο MHC τάξης II.

Οι δύο τάξεις των γονιδίων του MHC κωδικοποιούν για μόρια που διαφέρουν ως προς τον τύπο των T κυττάρων με τον οποίο αλληλεπιδρούν. Τα γονίδια της τάξης I κωδικοποιούν πεπτίδια που παρουσιάζουν ενδοκυτταρικά παθογόνα στα κυτταροτοξικά T κύτταρα. (Messaoudi et al, 2002) Τα γονίδια της τάξης II κωδικοποιούν πεπτίδια που παρουσιάζουν τα ξένα αντιγόνα στα βοηθητικά T κύτταρα. (Miller et al, 1997) Μέσω αυτών των μηχανισμών προκαλείται η χυμική και η κυτταρική ανοσοαπόκριση.

Κάθε άτομο έχει ένα περιορισμένο αριθμό διαφορετικών μορίων MHC τα οποία πρέπει να είναι ικανά να παρουσιάσουν ένα τεράστιο αριθμό και ποικιλία αντιγόνων. Η χαμηλή συγγένεια που απαιτείται για την σύνδεση εξασφαλίζει ότι στο ίδιο μόριο MHC μπορούν να συνδεθούν πολλά διαφορετικά πεπτίδια. Ο βραδύς ρυθμός διάστασης εξασφαλίζει ότι από τη στιγμή που ένα μόριο MHC συνδέεται με ένα πεπτίδιο, θα το παρουσιάζει για μεγάλο χρονικό διάστημα μεγιστοποιώντας την πιθανότητα αναγνώρισης από ένα T κύτταρο και έναρξης της ανοσοαπόκρισης.

Εκτός από τα κλασικά γονίδια MHC, υπάρχουν και τα μη κλασικά γονίδια MHC και τα MHC ψευδογονίδια. Τα μη κλασικά γονίδια MHC είναι μόρια που σχετίζονται δομικά και με τις δύο τάξεις αλλά δεν συμμετέχουν στην παρουσίαση των πεπτιδικών αντιγόνων στα T κύτταρα. Τα μη κλασικά μόρια τάξης II ρυθμίζουν τη σύνδεση των πεπτιδίων στα κλασικά MHC τάξης II μόρια. Τα μη κλασικά μόρια τάξης I είναι περισσότερα σε αριθμό και πιο ποικίλα και μερικά είναι σημαντικά για την ενεργοποίηση εξειδικευμένων T κυττάρων. (Edwards and Hedrick, review) Τα μη κλασικά γονίδια απαντώνται συνήθως ως cDNA αλλά έχουν περιορισμένη έκφραση και παρουσία στην κυτταρική επιφάνεια. Τα γονίδια αυτά πιθανολογείται ότι αντιπροσωπεύουν μια ενδιάμεση μορφή μεταξύ των κλασικών γονιδίων και των ψευδογονιδίων.

Επιπλέον, παρουσιάζουν μικρότερο βαθμό πολυμορφισμού και εμπεριέχουν διαφορετικά κωδικόνια σε σχέση με τα κλασικά MHC γονίδια. Τα ψευδογονίδια δεν εκφράζονται, δεν απαντώνται ούτε σαν cDNA στο εσωτερικό του κυττάρου και είναι μονομορφικά. (Miller et al, 1997, Hess et al . 2000 )

Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές, τα γονίδια MHC εμπλέκονται και σε λειτουργίες που δε σχετίζονται με την ανοσοαπόκριση. Οι πιο αξιοσημείωτες είναι οι αλληλεπιδράσεις με άλλους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, και ιδιαίτερα με τον υποδοχέα της τρανσφερίνης (TfR), τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα και διάφορους υποδοχείς ορμονών (πχ ινσουλίνης) , καθώς και η μεταγωγή σήματος. (Phillips et al 1986; Schreiber et al,1984, Fehlmann et al, 1985)

### *Εξέλιξη του MHC*

Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα είναι το μόνο σύστημα άμυνας στα ασπόνδυλα. Απαντάται και στα σπονδυλωτά, στα οποία όμως το κύριο ανοσοποιητικό σύστημα είναι το προσαρμόσιμο ανοσοποιητικό σύστημα που περιέχει τα γονίδια των MHC, TCR και Ig (και ένζυμα με δράση ρεκομπινάσης όπως η RAG1). Αυτά τα κύρια στοιχεία απουσιάζουν από τα ασπόνδυλα αλλά και από τα πρωτόγονα αγναθοστόματα σπονδυλωτά (Klein et al, 1998; Matsunaga et al,1998) . Το προσαρμόσιμο ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται να έχει εξελιχθεί από τα πιο πρωτόγονα γναθοστόματα σπονδυλωτά όπως οι χονδροιχθύες (καρχαρίας, σαλάχι). (Kasahara et al,1992; Okamura et al, 1997)

Το MHC θεωρείται ότι εξελίχθηκε ακολουθώντας διπλασιασμό των γονιδίων βασικών λειτουργιών σε κάποια χρονική περίοδο που

εντοπίζεται μετά τον διαχωρισμό από τα αγναθοστόματα σπονδυλωτά. Ο διπλασιασμός πιθανόν να επέτρεψε στο ένα γονίδιο να διατηρήσει τη βασική του λειτουργία και το άλλο να διαφοροποιηθεί (Kasahara et al, 1996; Kasahara, Nakaya et al, 1996) .

Δεν έχει προσδιοριστεί σαφώς μέχρι σήμερα ποια τάξη του MHC εξελίχθηκε πριν από την άλλη. Ενώ, λοιπόν, αναφέρεται ότι η τάξη II εξελίχθηκε πρώτη, υπάρχει και η αντίθετη άποψη που υποστηρίζει ότι η τάξη I δημιουργήθηκε πρώτη ως αποτέλεσμα ανασυνδυασμού μεταξύ μιας καρβοξυτελικής περιοχής που μοιάζει με ανοσοσφαιρίνη και της περιοχής πρόσδεσης πεπτιδίου μιας HSP70 πρωτεΐνης. (Flajnik et al, 1991) Μια φυλογενετική ανάλυση υποδεικνύει τη σχέση μεταξύ της  $\alpha$  αλυσίδας της τάξης II του MHC και της  $\beta 2$  μικροσφαιρίνης και μεταξύ της  $\beta$  αλυσίδας της τάξης II του MHC και της  $\alpha$  αλυσίδας της τάξης I. Τα περισσότερα στοιχεία συνηγορούν υπέρ της υπόθεσης ότι το αρχέγονο μόριο MHC είχε μια δομή που προσομοιάζει με τα μόρια της τάξης II και από αυτά δημιουργήθηκαν στη συνέχεια τα μόρια της τάξης I. (Hughes & Nei, 1993)

### *Το MHC των ιχθύων*

Το πρώτο μόριο του MHC στα ψάρια ανιχνεύθηκε το 1990 με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκφυλισμένους εκκινητές (αποφεύγοντας έτσι το πρόβλημα της χαμηλής ομοιότητας των αλληλουχιών μεταξύ των ανώτερων σπονδυλωτών και των ψαριών). Έκτοτε, το MHC των ψαριών έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον και μελετάται όχι μόνο από εξελικτικής άποψης αλλά και λόγω των πιθανών πρακτικών συνεπειών στην εκτροφή των ψαριών αυτών. ((Dixon et al., 1995; Grimholt et al., 2002; Stet et al., 2002; Consuegra et al., 2005); Έτσι, η

γνώση για τα μόρια MHC των ψαριών αυξάνεται ραγδαία. Όλα τα πρόσφατα δεδομένα αναφέρονται σε ένα λειτουργικό σύστημα MHC στα ψάρια. Φαίνεται να υπάρχουν πολλοί γονιδιακοί τόποι και πολλά αλληλόμορφα και για τις δύο τάξεις των γονιδίων MHC, αλλά η έλλειψη γνώσεων για τους λειτουργικούς γονιδιακούς τόπους έναντι των ψευδογονιδίων και των μη κλασικών γονιδιακών τόπων δυσχεραίνει τον προσδιορισμό του ακριβούς αριθμού που απαντάται σε κάθε είδος.

Στα θηλαστικά ο γενετικός τόπος του MHC υπάρχει σε ένα χρωμόσωμα σε μια ομάδα σύνδεσης, ενώ η δομή του MHC στα ψάρια φαίνεται να είναι τελείως διαφορετική. (Cardwell et al,2001) Η δομή και η οργάνωση των γονιδίων του MHC στους τελεόστεους ιχθύες ποικίλλει αξιοσημείωτα ανάμεσα στις διάφορες τάξεις. Τα γονίδια της τάξης I και II των θηλαστικών πάντα απαντώνται σε κοντινές περιοχές του ίδιου χρωμοσώματος. Ωστόσο, οι ενδείξεις από διαφορετικές ομάδες ψαριών προτείνουν ότι οι συστάδες γονιδίων της τάξης I και II ανασυνδυάζονται ελεύθερα και πιθανώς βρίσκονται και σε διαφορετικά χρωμοσώματα, όπως επίσης έχει διαπιστωθεί και η ύπαρξη 2 διαφορετικών συστάδων γονιδίων της τάξης II (Sato et al. 2000). Σε αντίθεση με άλλα σπονδυλωτά, το MHC των τελεόστεων έχει υποστεί εκτεταμένη γενωμική αναδιοργάνωση (Nonaka et al., 2001). Τα γονίδια του MHC τάξης I και II σχηματίζουν ένα στενά συνδεδεμένο σύμπλεγμα στα περισσότερα σπονδυλωτά. (Nonaka et al., 1997; Kaufman et al., 1999). Ωστόσο, στους τελεόστεους τα γονίδια της τάξης I και της τάξης II βρίσκονται σε διαφορετικές ομάδες σύνδεσης. (Sato et al., 2000; Nonaka et al., 2001; Shum et al., 2001). Μια πιθανή εξήγηση για αυτή τη διάκριση ανάμεσα στο MHC των τελεόστεων και των θηλαστικών είναι ότι διαφορετικά παράλογα γονίδια τάξης I και τάξης II διατήρησαν τη λειτουργικότητά τους μετά την διπλασιασμό του γενώματος στον πρώτο-χορδωτό πρόγονο, υπόθεση των Ohno (1970) και Kasahara και των συνεργατών τους (1997). Οι οικογένειες

γονιδίων του MHC στα σαλμονοειδή είναι επίσης διαφοροποιημένες, συγκρινόμενες με τα θηλαστικά και τα περισσότερα Ευτελεόστεα ψάρια.

Στα σαλμονοειδή δεν υπάρχει ένας γενετικός τόπος που μπορεί να πάρει την ονομασία MHC. Η απουσία σύνδεσης μεταξύ γονιδίων της τάξης I και της τάξης II έχει πιθανώς μεγάλη σημασία για τον τρόπο με τον οποίο η φυσική επιλογή διαμορφώνει τον πολυμορφισμό στους ξεχωριστούς τόπους της τάξης I και της τάξης II. Διευκρινιστικά, όταν δύο είδη γονιδίων είναι συνδεδεμένα, η επιλογή για ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο τάξης II αναπόφευκτα αλλάζει την αλληλική συχνότητα σε ένα γονιδιακό τόπο της τάξης I, ο οποίος δεν επιλέγεται άμεσα αλλά είναι συνδεδεμένος. Αυτό φυσικά μπορεί να συμβεί και αντίστροφα. Αντίθετα, η επιλογή στον γενετικό τόπο της τάξης II δε θα επηρεάσει τις αλληλικές συχνότητες σε ένα γενετικό τόπο τάξης I που δεν επιλέγεται και δεν είναι συνδεδεμένος με αυτόν. (Shum et al, 2001)

Τα σαλμονοειδή θεωρείται ότι διαχωρίστηκαν νωρίς στην ιστορία των Euteleost (Lauder and Leim 1983). Τα διαθέσιμα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το MHC των σαλμονοειδών είναι σχετικά απλό και φέρει μόνο λίγα διπλασιασμένα γονίδια (Miller and Withler 1998). Κατά μέσο όρο τα θηλαστικά μπορούν να έχουν μέχρι δέκα αντίγραφα γονιδίων τάξης I και τάξης II. Παρομοίως, τα περισσότερα διαχωρισμένα τελεόστεα μπορεί να έχουν πάνω από 17 γονιδιακούς τόπους τάξης I. (Sato et al. 1997, 1998). Αντιθέτως τα σαλμονοειδή έχει εκτιμηθεί πρόσφατα ότι έχουν τρία γονίδια τάξης I (A, B, UA) και μόνο ένας γονιδιακός τόπος τάξης II έχει ανιχνευθεί. (Miller and Withler 1998).



## *Επιλογή στο MHC*

Οι γονιδιακοί τόποι των ΜΗ τάξης I και II δεν είναι συνδεδεμένοι στα τελεόστεα (Grimholt et al. 2002), οπότε οι επιλεκτικές πιέσεις και στις δύο ομάδες πρωτεϊνών μπορούν να προσεγγισθούν ανεξάρτητα (Καθώς τα γονίδια του MHC στα τελεόστεα δεν σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, είναι γνωστά απλά ως ΜΗ γονίδια σε αυτό το taxon (Stet et al. 2002))

Οι επιλεκτικές πιέσεις που επέδρασαν και επιδρούν στα ΜHC τάξης I και II είναι ποικίλες. Η εξαρτώμενη από παθογόνα επιλογή ευνοεί τη γενετική ποικιλομορφία του MHC μέσω του πλεονεκτήματος του ετεροζυγώτη (υπερκυριαρχία, Hughes and Nei, 1988) και της συχνοεξαρτώμενης επιλογής. Η επιλογή θεωρείται ότι ευνοεί τους σπάνιους γενότυπους όσον αφορά το MHC, αφού τα παθογόνα φαίνεται να έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να αποφεύγουν την MHC-εξαρτώμενη ανοσία που κωδικοποιείται από κοινούς γενότυπους του MHC. Έξι μοριακά μοντέλα επιλογής που μεσολαβείται από παθογόνα έχουν προταθεί, κάποια από τα οποία θα αναπτυχθούν παρακάτω.

1. Μοντέλα ελιγμού παθογόνων
2. Αποφυγή αναγνώρισης από μοναδικό κλώνο T κυττάρου
3. Αποφυγή παρουσίασης από το MHC
4. Αλληλεπιδράσεις παθογόνου- ξενιστή
5. Πλεονέκτημα ετεροζυγώτη
6. Αντοχή παθογόνων σε άλλο-MHC αντιγόνα

Στις επιλεκτικές πιέσεις όμως εμπλέκονται και μηχανισμοί που δεν σχετίζονται με παθογόνα. Η επιλογή μέσω της ομομικτικής κατάπτωσης δρα έμμεσα ευνοώντας το επιλεκτικό ζευγάρισμα που βασίζεται στο ΜΗC (επιλογή ζευγαρώματος) εδώ το ΜΗC αξιοποιείται για την ξεχωρίσει ενάντια στη γενετική ομοιότητα σε ιδιαίτερα πολυμορφικούς τόπους για την αποφυγή της ομομιξίας. Το ζευγάρισμα με ανόμοια άτομα ως προς το ΜΗC θα δημιουργήσει ετεροζυγους απογόνους τουλάχιστον όσον αφορά το ΜΗC το οποίο θα έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη αρμοστικότητα. Το ζευγάρισμα με ανόμοια λαμβάνοντας υπόψη την αυτό-ασυμβατότητα στα φυτά και το ΜΗC στα σπονδυλωτά έχει ως αποτέλεσμα το αποτέλεσμα του «σπάνιου» αρσενικού και συνεπώς και τη συχνοεξαρτώμενη επιλογή. Αυτό το είδος επιλογής συμβάλλει στα υψηλά ποσοστά γενετικού πολυμορφισμού που παρατηρούνται στους γενετικούς τόπους του ΜΗC. Τέλος, οι αναπαραγωγικοί μηχανισμοί συμβάλλουν στην επιλογή των ΜΗC. Έμβρυα που είναι διαφορετικά από τις μητέρες τους έχουν αυξημένη πιθανότητα να επιζήσουν. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω επιλογής ζευγαρώματος, επιλεκτικής γονιμοποίησης και επιλεκτικής αποβολής. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται είναι άγνωστοι αλλά η αυτό-ασυμβατότητα στα φυτά και η αλλοαναγνώριση στα ασπόνδυλα αποτελούν παραδείγματα επιλεκτικής γονιμοποίησης.

### *ΜΗC & Επιλογή συντρόφου*

Σύμφωνα με τη θεωρία επιλογής συντρόφων με βάση την ετεροζυγωτία, τα άτομα διασταυρώνονται έτσι ώστε να αυξηθεί η ετεροζυγωτία των απογόνων τους. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, οι ατλαντικοί σολομοί επιλέγουν τους συντρόφους τους με σκοπό να αυξήσουν την ετεροζυγωτία των απογόνων στο ΜΗC και



ειδικότερα στην περιοχή δέσμευσης του πεπτιδίου, παρέχοντας τους έτσι καλύτερους αμυντικούς μηχανισμούς έναντι των παράσιτων και των παθογόνων.

Πολλές υποθέσεις έχουν διατυπωθεί για την εξαρτώμενη από το MHC επιλογή συντρόφου. Πρώτον, καθώς τα γονίδια αυτά είναι ιδιαίτερα πολυμορφικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ένα στοιχείο για το διαχωρισμό της συγγένειας. Επομένως η εξαρτώμενη από το MHC επιλογή συντρόφου μπορεί να είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος αποφυγής της αιμομιξίας και ενίσχυσης της ποικιλότητας των απογόνων. Δεύτερον, καθώς οι ετεροζυγώτες απόγονοι μπορούν να προστατευθούν έναντι περισσότερων παράσιτων σε σχέση με τους ομοζυγώτες, οι διασταυρώσεις που καθορίζονται από το MHC οδηγούν σε απογόνους με ενισχυμένη ανοσολογική εποπτεία. Οι απόγονοι που προέρχονται από ανόμοιους γονείς ως προς το MHC θα έχουν υψηλή αρμοστικότητα χάρη στα μειωμένα επίπεδα της ομομικτικής κατάπτωσης και την αυξημένη ανθεκτικότητα σε μολυσματικές ασθένειες χάρη στην αυξημένη ετεροζυγωτία του MHC. Η βάση του μηχανισμού είναι ότι τα σπονδυλωτά μπορούν να εντοπίσουν τον γενότυπο του MHC με την όσφρηση (Penn & Potts 1999; Rajakaruna *et al* . 2001; Olsen *et al* 2002.). Αφού η κοινή παρουσία ιδιαίτερα πολυμορφικών μοριακών δεικτών είναι μια ένδειξη συγγένειας, η αποφυγή ζευγαρώματος με ζώα που έχουν παρόμοιο γονότυπο MHC θα μειώσει την πιθανότητα του ζευγαρώματος με συγγενείς (ομομιξία). Η αναγνώριση συγγένειας μέσω MHC-συνδεόμενης χημειοδεκτικής ταυτότητας έχει διαπιστωθεί. Συνεπώς, ως το πιο πολυμορφικό σύστημα, το MHC συνεισφέρει στη γενετική ταυτότητα ενός ατόμου με μεγαλύτερη ικανότητα διάκρισης και αυτό εκφράζεται ως χημειοδεκτική ταυτότητα. Η αυτό-ασυμβατότητα στα φυτά εξελίχθηκε για να εξασφαλίσει το ζευγάρωμα ανόμοιων ώστε να αποφευχθεί η ομομιξία, και το MHC των σπονδυλωτών μπορεί να εξυπηρετεί τον ίδιο σκοπό. Παρατηρήσεις

συμπεριφοράς και μοριακές αναλύσεις έδειξαν ότι θηλυκά ποντίκια συχνά άφηναν την περιοχή τους, και ζευγάρωναν με αρσενικά εκτός περιοχής που είχαν διαφορετικούς απλότυπους MHC.

Τα σαλμονοειδή ψάρια είναι κατάλληλα να χρησιμοποιηθούν σα μοντέλα ψαριών για τη διερεύνηση των παραπάνω υποθέσεων. Δεδομένου ότι η όσφρηση επηρεάζει άλλους ηθολογικούς μηχανισμούς, όπως είναι η επιστροφή στον τόπο καταγωγής και η αναγνώριση των συγγενών, η αλληλική σύνθεση των γονιδίων του MHC θα μπορούσε να είναι ένας σημαντικός παράγοντας που να καθορίζει την επιλογή συντρόφων. Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί του MHC που έχουν περιγραφεί στους σολομούς υποδεικνύουν ότι τα γονίδια αυτά εξελίσσονται παρόμοια με τα αντίστοιχα γονίδια των θηλαστικών και αυτό φαίνεται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την αρμοστικότητα των ατόμων. Επιπρόσθετα, θεωρείται απίθανο ο θηλυκός ατλαντικός σολομός να επωφελείται από την επιλογή συντρόφου, καθώς δεν υφίσταται πατρική φροντίδα μετά τη γέννα στα είδη αυτά και ένα αρσενικό είναι εν δυνάμει ικανό να γονιμοποιήσει όλα τα αυγά που παράγει ένα θηλυκό. Επομένως, η επιλογή συντρόφου στον ατλαντικό σολομό θα πρέπει θεωρητικά να κατευθύνεται από πιθανά γενετικά οφέλη.

### *Ποικιλομορφία του MHC*

Ο σημαντικός ρόλος τους στην ανοσολογική αναγνώριση των παράσιτων και των παθογόνων υποδεικνύει ότι το MHC πιθανότατα σχετίζεται με ποιοτικά χαρακτηριστικά που συνδέονται με την αρμοστικότητα και την συμπεριφορά των ατόμων στους φυσικούς πληθυσμούς.

Τα γονίδια του ΜΗC είναι τα πιο πολυμορφικά γονίδια στο γονιδίωμα των σπονδυλωτών (Marsh et al., 2000). Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο πολυμορφισμός δημιουργήθηκε εξελικτικά για να εξασφαλιστεί ότι ο πληθυσμός θα έχει ικανό αριθμό αλληλομόρφων ώστε να αντεπεξέλθει σε κάθε είδους μόλυνση. Μέσω της ύπαρξης πολυμορφικών γονιδίων τουλάχιστον κάποια άτομα ενός πληθυσμού θα είναι ικανά να εγείρουν αποτελεσματικές ανοσοαπαντήσεις κατά οποιουδήποτε πεπτιδίου – αντιγόνου. Επομένως, η ποικιλότητα των ΜΗC επηρεάζει την αρμοστικότητα των ατόμων, την δυναμική του πληθυσμού και την βιωσιμότητα.

Έχει προταθεί ότι η κύρια εξελικτική δύναμη που διατηρεί και προάγει την ποικιλομορφία των γονιδίων ΜΗC είναι η ισοζυγούσα επιλογή που διαμεσολαβείται από παθογόνα μέσω είτε υπερκυριαρχίας (Hughes & Nei, 1989; Klein & O’Higin 1994) είτε αρνητικής συχνοεξαρτώμενης επιλογής (Takahata & Nei, 1990). Ωστόσο, για την ερμηνεία της διατήρησης του ΜΗC πολυμορφισμού έχουν προταθεί και άλλοι μηχανισμοί:

Επικρατούσα επιλογή (πλεονέκτημα ετεροζυγωτού έναντι ομοζυγωτού λόγω πιο αποτελεσματικής αρνητικής επιλογής σε κλώνους αυτοδραστικών κυττάρων T).

Εξαρτώμενη από την συχνότητα επιλογή (ελάττωση της Δαρβινικής προσαρμογής ενός αλληλομόρφου με αύξηση της συχνότητάς του).

Μη τυχαίες διασταυρώσεις.

Επιλεκτική αποβολή ιστοσυμβατών εμβρύων. Αν και εμπειρικά στοιχεία ευνοούν τον πρώτο μηχανισμό δεν αποκλείεται η δράση και των υπολοίπων

Η επιλογή μπορεί να ευνοεί την ετεροζυγωτία στους τόπους του MHC, επειδή τα άτομα αυτά έχουν αυξημένη ικανότητα στην αντιμετώπιση μιας μεγάλης ποικιλίας παθογόνων, ή ακόμη επειδή τα ετερομικτικά άτομα που είναι ετερόζυγα σε μεγάλο μέρος του γενώματος τους εμφανίζουν μεγαλύτερη αρμοστικότητα. Έτσι, η άμεση ή η έμμεση επιλογή ή ακόμα και ο συνδυασμός τους μπορούν να οδηγήσουν στους υψηλούς ρυθμούς των μη συνώνυμων αντικαταστάσεων στις περιοχές δέσμευσης του αντιγόνου στα μόρια του MHC.

Ο πολυμορφισμός των γονιδίων MHC έγκειται τόσο στον αριθμό των αλληλομόρφων που απαντώνται σε φυσικούς πληθυσμούς όσο και στις διαφορές μεταξύ των αλληλουχιών των διαφόρων αλληλομόρφων. Οι πολυμορφισμοί στα μόρια τάξης I εντοπίζονται στις περιοχές  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$  της  $\alpha$  αλυσίδας και σχετίζονται με την ικανότητα διαφορετικών μορίων MHC να παρουσιάζουν πεπτίδια. Άλλοι πολυμορφισμοί των μορίων αυτών συνεισφέρουν σε διαφοροποιήσεις που επηρεάζουν την αναγνώριση από T κύτταρα. Η περιοχή  $\alpha 3$  είναι σταθερή και περιέχει τη θέση σύνδεσης για το συνυποδοχέα CD8 των T κυττάρων. Οι πολυμορφισμοί στα μόρια τάξης II απαντώνται κυρίως στις περιοχές  $\alpha 1$  και  $\beta 1$ .

Είδος – *Salmo trutta*

### Συστηματική κατάταξη

Φύλο: Vertebrata

Υποφύλο: Craniata

Υπέρταξη: Gnathostomata

Κλάση: Pisces

Τάξη: Teleostei

Υποτάξη: Actinopterygii

Οικογένεια: Salmonidae

Γένος: *Salmo*

Είδος: *Salmo trutta*

### Περιοχές διαβίωσης

Η *Salmo trutta* είναι φυσικό είδος της Ευρώπης, που συναντάται από την Ισλανδία μέχρι τον Καύκασο και την Αράλη. Επίσης βρίσκεται στη μικρά Ασία και το Λίβανο καθώς και στη βόρεια Αφρική στα όρη του Ατλαντα. Έχει εισαχθεί με επιτυχία στην Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, Αφρική, Πακιστάν, Βόρεια και Νότια Αμερική όπου, σε πολλές περιπτώσεις, εκτοπίζει τα υπάρχοντα είδη των Salmonidae. Οι περισσότερες εισαγωγές έγιναν κατά τα τέλη του 18<sup>ου</sup> αιώνα και στο πρώτο μισό του 19<sup>ου</sup> αιώνα, δηλαδή πριν αναγνωρισθούν οι κίνδυνοι που προκύπτουν από τους εμπλουτισμούς με εξωτικά είδη.

Στην Ελλάδα το είδος *S. trutta* βρίσκεται στα παρακάτω ποτάμια συστήματα:

Σύστημα Νέστου (Αρκουδόρεμα, Δεσπάτης, Διαβολόρεμα)

Άρδας, παραπόταμος του Έβρου

Σύστημα του Στρυμόνα (Άγκιστρο Σερρών)

Τριπόταμος Βέροιας

Σύστημα του Αξιού (Σκοπός και Δροσοπηγή Φλώρινας)

Άγιος Γερμανός Πρεσπών

Ποτάμια της Ηπείρου (Αώος, Βοϊδομάτης, Αραχθος, Θύαμη, Λούρος)

Σύστημα του Αχελώου

Εύηνος

Μόρνος

Σύστημα του Αλφειού (Πελοπόννησος)

### *Κατοικία*

Οι πέστροφες είναι ένα ανάδρομο είδος, που ξεκινούν τη ζωή τους σε περιοχές με γλυκό νερό, πριν να μεταναστεύσουν σε περιβάλλοντα με αλμυρό νερό. Μένουν στον ωκεανό για 1-7 χρόνια όπου αναπτύσσονται και γίνονται σεξουαλικά ώριμα. Όταν έρθει η ώρα της αναπαραγωγής, χρησιμοποιούν διάφορα στοιχεία, όπως οι παλίρροιας, η θερμοκρασία, η διαβάθμιση αλατότητας για να εντοπίσουν τον ποταμό καταγωγής τους. Κατά το ταξίδι της επιστροφής, κάποια άτομα μπορεί να ταξιδέψουν μέχρι και 3000 μίλια. Οι πέστροφες προτιμούν δροσερά, καθαρά ποτάμια και λίμνες με θερμοκρασίες 12-19° C. Είναι προσεκτικά ψάρια και ψάχνουν για καταφύγιο περισσότερο από όλα τα άλλα σαλμονοειδή. Στα τρεχούμενα νερά, βρίσκουνε συνήθως καταφύγιο σε βράχια, σε πυκνή βλάστηση και σε επιφανειακές αναταράξεις του νερού.

## Φυσική περιγραφή

Το είδος *Salmo trutta* ανήκει στην οικογένεια Salmonidae της οποίας τα είδη χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά μεγάλη πλαστικότητα και ποικιλομορφία στα μορφολογικά, οικολογικά και ηθολογικά χαρακτηριστικά

Μερικά κύρια χαρακτηριστικά είναι τα εξής :

- Τα πλευρά τους είναι ασημί ή κίτρινα και η κοιλιακή χώρα άσπρη ή κίτρινη
- Σκούρες κηλίδες, μερικές φορές περικλειστές από ένα ωχρού περιγράμματος, βρίσκονται σε αφθονία στη ράχη και στα πλευρά
- Η κηλίδωση είναι μερικές φορές εμφανής και στο κεφάλι και στα πτερύγια κατά μήκος της ράχης
- Κόκκινες κηλίδες υπάρχουν επίσης στα πλευρά
- Το μικρό λιπώδες πτερύγιο μπροστά από την ουρά έχει μια κοκκινωπή χροιά
- Η πέστροφα της θάλασσας έχει πιο ασημί χρωματισμό και λιγότερο εμφανή κηλίδωση

Τα ενήλικα άτομα μπορούν να φτάσουν σε μέγεθος μέχρι και τα 103 cm (Page and Burr 1995) αλλά το μέγιστο μήκος διαφέρει μεταξύ των ενδιαιτημάτων. Οι πέστροφες που ζουν σε μικρά ρέματα με περιορισμένα αποθέματα τροφής μπορεί να φτάσουν μέχρι και 25cm, ενώ σε άλλα περισσότερο παραγωγικά ποτάμια, τα ενήλικα άτομα φτάνουν σε μήκος τα 35 με 76cm. (Bachman 1991, Behnke 2002).

Όσον αφορά το βάρος, τα ενήλικα άτομα κυμαίνονται από 2,3 με 3,2kg, ενώ έχει καταγραφεί και άτομο που ζύγιζε 31 kg, στην Ευρώπη.

Τα ώριμα αρσενικά και θηλυκά άτομα εμφανίζουν κάποιο φυλετικό διμορφισμό. Τα αρσενικά έχουν στρογγυλεμένο οπίσθιο πτερύγιο ενώ τα θηλυκά διατηρούν το κοίλο σχήμα, πού είναι χαρακτηριστικό της «ανώριμης» πέστροφας (Simpson and Wallace 1982, Bachman 1991, Page and Burr 1991). Επίσης τα αρσενικά τείνουν να έχουν μεγαλύτερο και πιο επίπεδο κεφάλι από τα θηλυκά (Simpson and Wallace 1982, Bachman 1991)

### *Αναπαραγωγή*

Η αναπαραγωγική περίοδος είναι κατά τους φθινοπωρινούς μήνες.

Στις πέστροφες εμφανίζεται το φαινόμενο της πολυτοκίας. Η ωοτοκία συμβαίνει μόνο κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου κάθε χρόνο, αλλά τα άτομα μπορούν να γεννήσουν πολλές φορές κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Σε μερικούς πληθυσμούς που κατοικούν σε ποτάμια, τα άτομα μπορούν να γεννούν αυγά κάθε χρόνο μετά την ωρίμανση τους, αλλά επειδή αυτά τα άτομα έχουν μικρή διάρκεια ζωής (περίπου 5 χρόνια), η ευκαιρία να γεννήσουν τους δίνεται μόνο λίγες φορές κατά τη διάρκεια της ζωής τους.

Επιστρέφουν στο ποτάμι όπου είχαν γεννηθεί, επιλέγοντας περιοχές ωοτοκίας όπου η παροχή νερού είναι καλή μέσω του αμμώδους υποστρώματος. Το θηλυκό χρησιμοποιεί το σώμα της για να σκάψει μια φωλιά στην άμμο. Μπορεί εκεί πέρα να γεννήσει τα αυγά της πολλές φορές. Ένα θηλυκό περίπου 2,3kg παράγει κατά μέσο όρο 3400 αυγά, που έχουν χρυσό χρώμα και έχουν διάμετρο 4-5mm. Τα αρσενικά εναποθέτουν το σπέρμα τους πάνω από τα αυγά. Τα θηλυκά καλύπτουν τα αυγά τους



με άμμο μετά την ωστοκία. Τα αυγά αναπτύσσονται αργά κατά τη διάρκεια του χειμώνα και εκκολάπτονται την άνοιξη. Μια καλή ροή καθαρού και καλά οξυγονωμένου νερού είναι απαραίτητη για την επιτυχημένη ανάπτυξη των αυγών.

### *Γονιμότητα και επιβίωση*

Η αναπαραγωγική επιτυχία στην πέστροφα όσον αφορά την επιβίωση των νεογνών είναι μικρή. Έτσι, παρόλο που τα άτομα έχουν μεγάλη αναπαραγωγική ικανότητα και παράγουν μεγάλο αριθμό αυγών, οι απόγονοι τους έχουν μεγάλο βαθμό θνησιμότητας, ιδιαίτερα κατά τα αρχικά στάδια της ζωής τους. Γενικά, η επιβίωση και η γονιμότητα στα ψάρια είναι αντιστρόφως ανάλογη με την αναπαραγωγική ικανότητα, δηλαδή ψάρια με μεγάλη αναπαραγωγική ικανότητα εμφανίζεται να έχουν μικρή γονιμότητα (Moyle and Cech 2000).

### *Διατροφικές συνήθειες*

Οι πέστροφες είναι σαρκοφάγα ψάρια. Το διαιτολόγιό τους περιλαμβάνει έντομα και κάμπιες, οστρακόδερμα, σαλαμάνδρες, βατράχους, μαλάκια, μικρά τρωκτικά και άλλα ψάρια. Τα νεογέννητα ψάρια τρέφονται με ζωοπλαγκτόν και μικρά ασπόνδυλα.

### *Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο*

Οι πέστροφες παρουσιάζουν μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον. Οι φυσικοί πληθυσμοί τους είναι από τους σημαντικότερους αλιευόμενους

στο Βόρειο ημισφαίριο. Επιπλέον τα είδη της οικογένειας αυτής είναι από τα πρώτα που χρησιμοποιήθηκαν συστηματικά στην ιχθυοκαλλιέργεια

### *Ασθένειες*

Γενικά, τα παθογόνα των ψαριών υπάρχουν σε όλα τα συστήματα φρέσκου νερού και τα υγιή ψάρια μπορούν να αντέξουν την περιστασιακή έκθεση ή το να φέρουν κάποια παθογόνα (Strange 1996). Κάτω από ορισμένες συνθήκες τα ψάρια μπορεί να ασθενήσουν και να επηρεαστεί η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή και η επιβίωσή τους. Η αλληλεπίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως είναι η υποβιβασμένη ποιότητα του νερού, η μεγάλη πυκνότητα των ψαριών, οι ρύποι και άλλα περιβαλλοντικοί παράγοντες που προάγουν τα παθογόνα συμβάλουν σε μολύνσεις στους πληθυσμούς των ψαριών (Strange 1996). Οι θάνατοι των ψαριών στο φυσικό περιβάλλον προκαλείται συνήθως από αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες ενώ στα εκτροφεία από ξεσπάσματα σημαντικών ασθενειών.

Οι ασθένειες που αναφέρεται ότι προσβάλλουν τις πέστροφες οφείλονται είτε σε παράσιτα (π.χ. εξωπαράσιτα στα βράγχια (documented by Schisler et al. 1999) είτε σε βακτήρια (π.χ. η δοθιήνωση, που προκαλείται από το *Aeromonas salmonicida*) (Mitchum 1982).

## *Κίνδυνοι*

Κάποιοι από τους κινδύνους που διατρέχουν οι πέστροφες λόγω της ανθρώπινης παρέμβασης είναι:

- Η δημιουργία φραγμάτων που αποτρέπουν τη ροή του νερού η οποία είναι απαραίτητη για τη μεταναστευση των ψαριών
- Τα εντομοκτόνα και τα ζιζανιοκτόνα από τις γεωργικές εκτάσεις μπορούν να μολύνουν τις οικοθέσεις των σαλμονοειδών και τις πηγές τροφής τους
- Η κατασκευή δρόμων κατά μήκος των ποταμών αλλάζει τις όχθες και προκαλεί διάβρωση που μειώνει τα ενδιαιτήματα
- Το κόψιμο της ξυλείας μειώνει τη σκιά που απαιτείται για να διατηρούνται τα ποτάμια δροσερά και μπορεί να συνδράμει στη διάβρωση των όχθων.
- Οι αποξηράνσεις απομακρύνουν τα ενδιαιτήματα
- Η υπεραλίευση μειώνει τους πληθυσμούς και καθιστά δύσκολο για τα σολομοειδή να ανακτήσουν και να διατηρήσουν το μέγεθος του πληθυσμού τους με την πάροδο του χρόνου.

## **Ανάλυση SSCP**

Η SSCP ανάλυση περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Orita και τους συνεργάτες του (1989). Η γενική ιδέα της τεχνικής είναι η αποδιάταξη μικρών προϊόντων PCR και η ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Καθώς τα PCR προϊόντα μετακινούνται διαμέσου της πηκτής επανακτούν τη δευτεροταγή τους δομή που εξαρτάται από την αλληλουχία (όπως και οι δευτεροταγείς δομές του RNA). Η κινητικότητα των μονόκλωνων

προϊόντων της PCR εξαρτάται από τη δευτεροταγή τους δομή. Επομένως, τα προϊόντα PCR που περιέχουν διαφορές στην αλληλουχία ή ακόμα και απαλοιφές ή προσθήκες θα έχουν διαφορετική κινητικότητα.

Το κύριο πλεονέκτημα της ανάλυσης SSCP είναι ότι πολλά ξεχωριστά προϊόντα PCR μπορούν να ελεγχθούν για διαφοροποιήσεις ταυτόχρονα. Η ανάλυση SSCP εφαρμόζεται για να μειωθεί ο αριθμός των αλληλουχήσεων που απαιτούνται για τον προσδιορισμό νέων αλληλομόρφων σε γενετικούς τόπους (e.g. Sweetman et al. 1992) ή για την καλύτερη εκτίμηση των αλληλικών συχνοτήτων σε πληθυσμούς (e.g. Aguadé et al. 1994). Υπάρχουν επίσης και άλλες εφαρμογές της ανάλυσης SSCP. Πρώτον, η ανάλυση SSCP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των PCR προϊόντων γονιδίων που πρόκειται να αλληλουχηθούν για φυλογενετικές αναλύσεις. Ο έλεγχος αυτός προσδιορίζει αν το γονίδιο περιέχει αρκετούς πολυμορφισμούς, πού εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί αυτοί, ποιο είναι το επίπεδο της ενδοειδική ποικιλότητας και αν υπάρχει πολυμορφισμός μεταξύ γονιδίων πολλαπλών αντιγράφων στα άτομα. Επιπλέον, η μέθοδος SSCP είναι κατάλληλη για την άντληση πληροφοριών σχετικά με τα επίπεδα των πολυμορφισμών σε πυρηνικούς γενετικούς τόπους.

Υπάρχουν όμως και δύο μειονεκτήματα στη μέθοδο SSCP. Πρώτον, οι διαφορές στην κινητικότητα δε σχετίζονται με τον αριθμό των διαφορών στην αλληλουχία. Επομένως, η μόνη πληροφορία που μπορεί να αντληθεί είναι κατά πόσο τα ενισχυμένα τμήματα είναι πανομοιότυπα ή διαφορετικά. Δεύτερον, το βέλτιστο μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων για την ανίχνευση των περισσότερων σημειακών μεταλλάξεων είναι ιδιαίτερα μικρό, περίπου 200bp.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## Υλικά

### Αντιδραστήρια

Acetic Acid  
Acrylamide  
Agarose  
Bis-Acrylamide  
Ammonium persulfate  
2-propanol  
Bromophenol Blue  
Boric acid  
Xylene Cyanol  
Chloroform  
NaCl  
SDS  
dNTPs  
EDTA  
Ethidium bromide  
EtOH  
Proteinase K  
Glycerol  
HCl 37%  
Formamide  
NaOH  
Formaldehyde  
MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O  
NaBH<sub>4</sub>  
Phenol  
Potassium Acetate  
TEMED  
Tris Base  
AgNO<sub>3</sub>  
100bp Ladder

### DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Taq (Hy Test)

### ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Mastercycler Gradient

## Μέθοδοι

### *Δείγματα*

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 111 δείγματα ιστού από άτομα *Salmo trutta* τα οποία συλλέχθηκαν από τις παρακάτω τοποθεσίες :

Τριπόταμος Βέροιας

Άγιος Γερμανός Πρεσπών

Σκοπός Φλώρινας

Αραχθος

Βοϊδομάτης

Αχελώος

Κροατία

Για την μελέτη του 2<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου UAA χρησιμοποιήθηκε DNA από 87 δείγματα και για τη μελέτη του 2<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου DAB χρησιμοποιήθηκε DNA από 77 δείγματα

### *Απομόνωση του DNA*

Για τη μελέτη του πολυμορφισμού σε επίπεδο γονιδίου απομονώνεται DNA από τα κύτταρα των οργανισμών. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε πυρηνικό DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνουν οι Brnatchez et al. (1988) το οποίο τροποποιήθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις του πειράματος. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

#### Extraction buffer (100ml)

- 2ml Tris-HCl 2M, pH 8,5
- 2ml EDTA 0,5M
- 4ml NaCl 5M
- 92ml ddH<sub>2</sub>O

#### Lysis buffer (100ml)

- 0,5ml Tris-HCl 2M pH 7,5
- 2ml EDTA 0,5M
- 3ml NaCl 5M
- 5ml SDS 10%
- 89,5ml ddH<sub>2</sub>O

Τα παραπάνω διαλύματα φυλάσσονται στους 4°C

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιούνται 50-100 mg ιστού και ακολουθήθηκαν οι εξής πειραματικές διαδικασίες :

1. Τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα eppendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 1ml extraction buffer.
2. Αναδεύουμε έντονα και φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία δωματίου στις 10.000 στροφές για 2 min.
3. Αδειάζουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, προσθέτουμε εκ νέου 1ml extraction buffer και επαναλαμβάνουμε το δεύτερο βήμα .
4. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και προσθέτουμε 400ml lysis buffer και 20 ml proteinase k (10 mg/ml), το οποίο προηγουμένως έχουμε ανακινήσει αρκετά.
5. Αναδεύουμε έντονα (vortex) ώστε να αναμιχθεί ο ιστός-ίζημα με το διάλυμα.
6. Τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο στους 50°C overnight.
7. Ανακινούμε τα δείγματα ανά μισή ώρα ώστε να επαναιωρείται το ίζημα .
8. Προσθέτουμε 150μl οξικού νατρίου 3M pH 5,2.
9. Αναδεύουμε έντονα και τοποθετούμε τα δείγματα στους -20°C για 15 min.



10. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 10 min στους 4°C.
11. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα eppendorf.
12. Προσθέτουμε 1ml εξισορροπημένης φαινόλης και αναδεύουμε έντονα.
13. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 20 min στους 4°C.
14. Μεταφέρουμε προσεκτικά την πάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα .
15. Προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24V:1V). Αναδεύουμε ελαφρά.
16. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 5 min στους 4°C .
17. Μεταφέρουμε την πάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα eppendorf.
18. Προσθέτουμε 1ml χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24V:1V) και αναδεύουμε ελαφρά.
19. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 5 min στους 4°C.
20. Μεταφέρουμε την πάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα eppendorf.
21. Προσθέτουμε 1ml ισοπροπανόλη .
22. Αναδεύουμε ελαφρά και επωάζουμε τα δείγματα για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
23. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 20 λεπτά στους 4° C .
24. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο παρατηρώντας ταυτόχρονα το ίζημα ώστε να μη μετακινηθεί.
25. Προσθέτουμε 1ml παγωμένης αιθανόλης 70%.
26. Ανακινούμε το δείγμα με το χέρι.
27. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 5 min στους 4°C.
28. Απομακρύνουμε πολύ προσεκτικά το υπερκείμενο παρατηρώντας το ίζημα.

29. Στεγνώνουμε τα δείγματα με επώαση στους 37°C για περίπου μια ώρα και προσέχουμε να μην υπάρχουν μικροσταγονίδια στα τοιχώματα του erpendorf.

30. Διαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100μl ddH<sub>2</sub>O.

31. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση ή στους -20°C για μελλοντική χρήση.

Το extraction buffer χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων καθώς το NaCl ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε κατάλληλο pH το οποίο ρυθμίζεται από το Tris-HCl. Ο ρόλος του χηλικού παράγοντα EDTA στο διάλυμα αυτό είναι να δεσμεύει τα ιόντα Ca<sup>++</sup> και Mg<sup>++</sup> τα οποία είναι απαραίτητα για την δράση των νουκλεασών. Το lysis buffer περιέχει επιπλέον SDS, το οποίο είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό και συμβάλλει στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης καθώς επίσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η proteinase K προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην επάνω υδάτινη φάση. Η μετέπειτα προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και η ακόλουθη πλύση του με αιθανόλη 70% βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

### *Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανα δείγμα*

Μετά το πέρας της απομόνωσης του DNA ελέγχεται ποιοτικά και ποσοτικά είτε με φωτομέτρηση είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v.

Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά από αραιώση 1μl δείγματος απομονωμένου DNA σε 49μl ddH<sub>2</sub>O. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA η οποία πρέπει να είναι πάνω από 150ng/μl. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA που αναμένεται να έχει τιμή περίπου 2 σε κατάλληλα για χρήση δείγματα.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης θα περιγραφεί παρακάτω.

### *Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)*

Για την ενίσχυση του 2<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου UAA και του 2<sup>ου</sup> εξονίου του DAB πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές :

Εκκινητής	Αλληλουχία
MHC I UAA KD6 Forward	5'-TCCCTGAAGTATTTCTACAT-3'
MHC I UAA KD6 Reverse	5'-TTTGGTTAAAACGCTGCTTTA-3'
MHC II DAB K12 Forward	5'-TCTCTGGAACAGATGGATATTT-3'
MHC II DAB K12 Reverse	5'-CGCCTGCTCTTGACCCAGGAT-3'

Η σύσταση των διαλυμάτων των αντιδράσεων περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Εκμαγείο DNA	2 μl
dNTPs (10mM each)	1 μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2 μl
Buffer 10x	5 μl
Εκκινητής Fw 50pmol/μl	1 μl
Εκκινητής Rv 50pmol/μl	1 μl
Taq DNA Polymerase 5 U/μl	0,2 μl
ddH <sub>2</sub> O	37,8 μl
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>50 μl</b>

Οι συνθήκες ενίσχυσης του 2<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου UAA είναι

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 5 min

Αποδιάταξη: 95° C για 40 sec

Συγκόλληση εκκινητών : 52° C για 1 min

Επιμήκυνση: 72° C για 30 sec

Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

} 35 κύκλοι

Οι συνθήκες ενίσχυσης του 2<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου DAB είναι

Αρχική αποδιάταξη : 95 για 5 min

Αποδιάταξη: 95 για 40 sec

Συγκόλληση εκκινητών: 50° C για 1 min

Επιμήκυνση: 72° C για 30 sec

Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

} 35 κύκλοι

Τα PCR προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

## *Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης*

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι τα εξής:

### TAE 50x (500ml)

Tris Base 121gr

Acetic Acid 28,5ml

EDTA 0,5M 50ml

ddH<sub>2</sub>O έως τα 500ml

### Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 1% w/v 1ml

TBE 20x 0,5ml

Glycerol 5ml

ddH<sub>2</sub>O έως τα 10ml

Αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύουμε 0,6gr αγαρόζης σε 30ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 3ml βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml). Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός. Η πηκτή τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer σε αυτά. Σε 5μl PCR προϊόντος προστίθενται 3μl loading buffer. Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης πραγματοποιείται για την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της ποιότητας των PCR προϊόντων που χρησιμοποιούνται σε περαιτέρω πειράματα για την ανάλυση των πολυμορφισμών.

### *Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)*

Η ανάλυση SSCP όπως έχει ήδη περιγραφεί βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στο πήκτωμα η οποία μπορεί να προκαλείται από μετάλλαξη ενός και μόνο νουκλεοτιδίου. Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης και τη χρώση της πηκτής για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

#### Αποδιάταξη PCR προϊόντων:

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε denaturation buffer, η σύσταση του οποίου είναι η εξής:

#### Denaturation buffer

95% formamide

0,05% Bromophenol blue

0,05% Xylene Cyanol

10mM NaOH

Σε 5-7μl PCR προϊόντος (ανάλογα με την συγκέντρωσή του) προστίθενται 10μl denaturation buffer και τα δείγματα επωάζονται για 6 min στους 96°C. Σκοπός της αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλιωνα. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλιωνα κατάσταση.

### Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

#### Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (200ml)

Ακρυλαμίδη 75gr

Bis-acrylamide 2gr

ddH<sub>2</sub>O έως τα 200ml

#### TBE 10x (2lt)

Tris Base 216gr

Boric acid 110gr

EDTA 16,6gr

ddH<sub>2</sub>O έως τα 2lt

#### Glycerol 50% v/v

#### APS 20% w/v

#### TEMED

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων για το 2<sup>ο</sup> εξόνιο του UAA χρησιμοποιείται πηκτή ακρυλαμίδης 10%, ενώ για το 2<sup>ο</sup> εξόνιο του DAB χρησιμοποιείται πηκτή ακρυλαμίδης 8%.

Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης 8 και 10% αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

	8%	10%
Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5%	10,6ml	13,3 ml
Glycerol 50%	8,3ml	8,3ml
TBE 10x	4,2ml	4,2ml
TEMED	66μl	66μl
APS 20%	375μl	375μl
H <sub>2</sub> O	Έως τα 62,5ml	Έως τα 62,5ml
Συνολικός όγκος	62,5ml	62,5ml

Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, ηλεκτροφορούνται τα αποδιατεταγμένα δείγματα με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 220 volts στους 4°C για 12 με 16 ώρες.

### Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο. Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :



Διάλυμα 1 (400ml)

EtOH 8ml

Acetic Acid 0,5ml

ddH<sub>2</sub>O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml)

Διάλυμα AgNO<sub>3</sub> 1gr/lt

Διάλυμα 3 (200ml)

NaOH 3gr

NaBH<sub>4</sub> 0,01gr

Formaldehyde 1ml

ddH<sub>2</sub>O έως τα 200ml

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύονται για 3 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί πλύση των πηκτών με απεσταγμένο νερό για 1min. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα AgNO<sub>3</sub> και οι πηκτές αναδεύονται για 20min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1min η κάθε μια. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές.

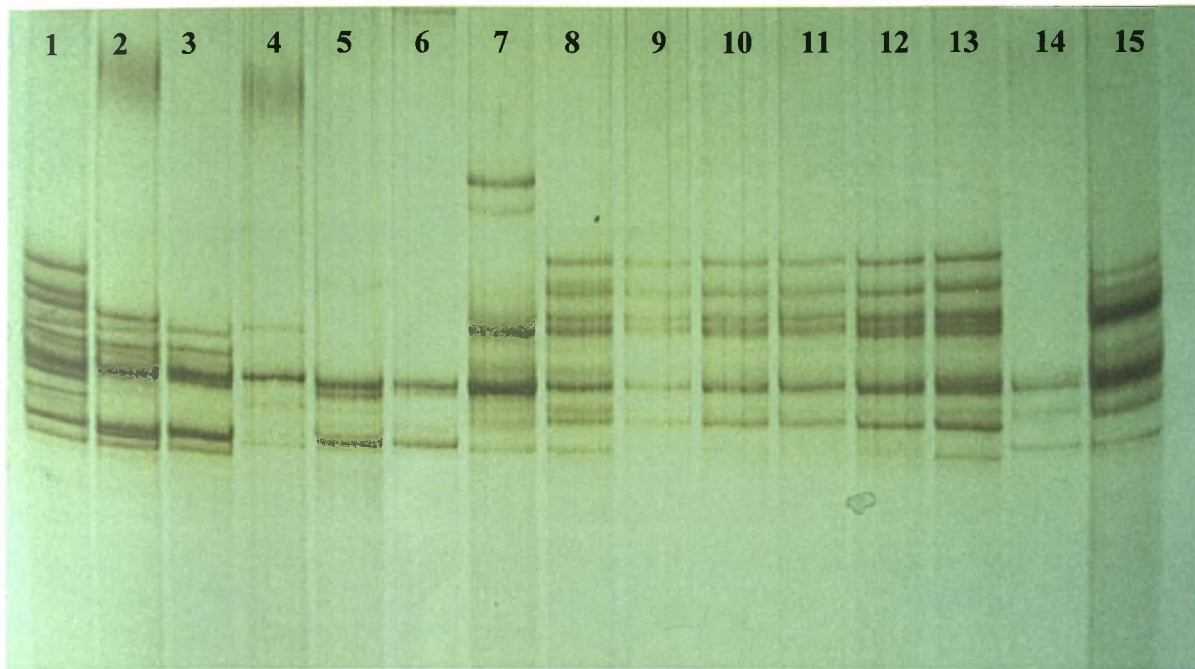
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε η μέθοδος PCR-SSCP για την ανάλυση του 2<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου UAA και του DAB. Στην πρώτη φάση της ανάλυσης τα εξόνια ενισχύθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Έπειτα, αναλύθηκαν τα προϊόντα με SSCP, μια ευαίσθητη μέθοδο για την μελέτη των πολυμορφισμών.

Η εφαρμογή της μεθόδου PCR-SSCP σε 87 άτομα του είδους *Salmo trutta* για το 2<sup>ο</sup> εξόνιο του γονιδίου UAA αποκάλυψε 12 διαφορετικά πρότυπα. Κάθε πρότυπο αντιστοιχεί σε διαφορετικό συνδυασμό αλληλομόρφων. Πιο συγκεκριμένα, στον πληθυσμό της Κροατίας (L) βρέθηκαν 2 πρότυπα, στον πληθυσμό του Τριπόταμου (TP) βρέθηκαν 2 πρότυπα, στον πληθυσμό των Πρεσπών (ΠΠ) βρέθηκαν 2 πρότυπα, στον πληθυσμό του Σκοπού (ΣΚ) 4 πρότυπα, και στον πληθυσμό από τον Άραχθο (ΑΡ) βρέθηκαν 2 πρότυπα, εκ των οποίων το ένα εμφανίζεται και στα άτομα του Βοϊδομάτη (B).

Κωδικός δείγματος	Πρότυπο	Κωδικός δείγματος	Πρότυπο	Κωδικός δείγματος	Πρότυπο
B11	12	L10	1	AP15	11
B17	12	L11	1	AP21	12
B21	12	L12	1		
		L13	2		
		L14	1		
		L16	1		
		L2	1		
		L20	1		
		L25	1		
		L26	1		
		L27	1		
		L28	2		
		L29	1		
		L3	1		
		L30	1		
		L4	2		

Κωδικός δείγματος	Πρότυπο	Κωδικός δείγματος	Πρότυπο	Κωδικός δείγματος	Πρότυπο
ΠΡ1	3	ΣΚ1	5	ΤΡ1	9
ΠΡ10	4	ΣΚ10	8	ΤΡ10	9
ΠΡ11	4	ΣΚ11	8	ΤΡ11	9
ΠΡ12	4	ΣΚ12	8	ΤΡ12	9
ΠΡ13	4	ΣΚ13	6	ΤΡ13	10
ΠΡ14	4	ΣΚ14	7	ΤΡ14	10
ΠΡ15	4	ΣΚ15	6	ΤΡ17	10
ΠΡ16	3	ΣΚ16	8	ΤΡ18	10
ΠΡ2	3	ΣΚ17	8	ΤΡ19	9
ΠΡ3	4	ΣΚ18	8	ΤΡ2	9
ΠΡ5	4	ΣΚ19	8	ΤΡ20	9
ΠΡ6	4	ΣΚ2	8	ΤΡ21	10
ΠΡ7	3	ΣΚ20	8	ΤΡ22	9
ΠΡ8	3	ΣΚ21	8	ΤΡ23	9
ΠΡ9	3	ΣΚ22	8	ΤΡ24	9
		ΣΚ23	8	ΤΡ25	10
		ΣΚ24	8	ΤΡ26	9
		ΣΚ25	8	ΤΡ27	9
		ΣΚ3	8	ΤΡ28	10
		ΣΚ4	8	ΤΡ29	10
		ΣΚ5	8	ΤΡ3	10
		ΣΚ6	8	ΤΡ30	9
		ΣΚ7	7	ΤΡ31	10
		ΣΚ8	7	ΤΡ4	10
		ΣΚ9	8	ΤΡ9	10
				ΤΡ3	10



**Εικόνα 2:** Πρότυπα που προκύπτουν από SSCP ανάλυση του 2ου εξονίου του UAA

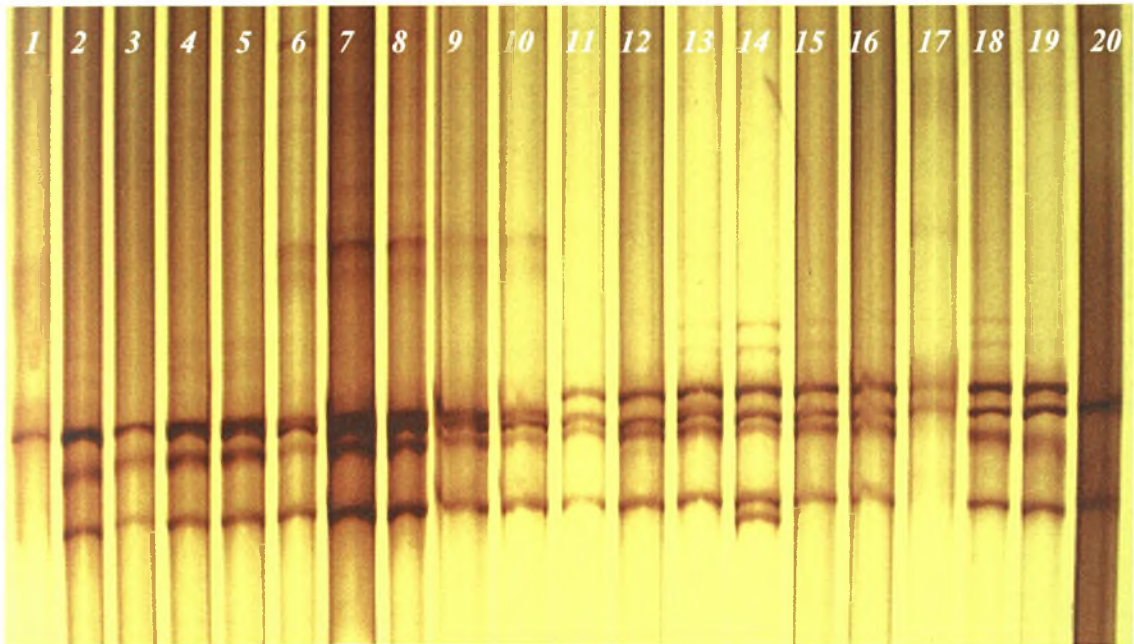
Στην εικόνα 2 παρουσιάζονται μερικά από τα πρότυπα που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο του SSCP για το 2<sup>ο</sup> εξόνιο του γονιδίου UAA. Όπως μπορούμε να διακρίνουμε, τα πρότυπα δεν αποτελούνται από τον ίδιο αριθμό αλληλομόρφων. Έτσι, άλλα πρότυπα αντιστοιχούν σε 1 αλληλόμορφο (π.χ. διαδρομή 6), ενώ άλλα αντιστοιχούν σε 2,3 ή ακόμα και 4 αλληλόμορφα (π.χ. διαδρομή 13). Βέβαια, ο ακριβής προσδιορισμός του αριθμού των αλληλομόρφων δεν είναι δυνατός μέσω αυτής της μεθόδου. Απλώς αποτελεί μια πρώτη ένδειξη της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων. Η ποικιλότητα αυτή μπορεί να διερευνηθεί εκτενέστερα με τεχνικές όπως η αλληλούχηση του DNA.

Αντίστοιχα, η εφαρμογή της μεθόδου PCR-SSCP σε 77 άτομα του είδους *Salmo trutta* για το 2<sup>ο</sup> εξόνιο του γονιδίου DAB αποκάλυψε 22 διαφορετικά πρότυπα. Πιο συγκεκριμένα, στον πληθυσμό της Κροατίας (L) βρέθηκαν 3 πρότυπα, στον πληθυσμό του Τριπόταμου (TP) βρέθηκαν 4 πρότυπα, στον πληθυσμό των Πρεσπών (ΠΠ) βρέθηκαν 4 πρότυπα, στον πληθυσμό του Σκοπού (ΣΚ) 4 πρότυπα, στον πληθυσμό από τον Άραχθο

(AP) βρέθηκαν 2 πρότυπα, στον πληθυσμό του Αχελώου βρέθηκαν 5 πρότυπα και στον πληθυσμό του Βοϊδομάτη 2 πρότυπα. Οι πληθυσμοί του Βοϊδομάτη και του Αχελώου εμφανίζουν ένα κοινό πρότυπο, όπως επίσης οι πληθυσμοί του Σκοπού και του Αραχθού.

Κωδικός δείγματος	Πρότυπο	Κωδικός δείγματος	Πρότυπο	Κωδικός δείγματος	Πρότυπο
L10	7	AP15	13	AX11	18
L13	9	AP21	12	AX12	22
L16	7	B1	18	AX13	18
L29	7	B2	18	AX14	18
L3	8	B4	18	AX15	18
L30	9	B7	19	AX16	21
L4	7			AX17	18
				AX19	18
				AX24	18
				AX25	18
				AX27	18
				AX3	20
				AX5	20
				AX6	18
				AX7	18
				AX9	18
				AX8	10
				AX18	10

Κωδικός δείγματος	Πρότυπο	Κωδικός δείγματος	Πρότυπο	Κωδικός δείγματος	Πρότυπο
ΠΡ1	17	ΣΚ10	5	ΤΡ1	1
ΠΡ11	15	ΣΚ13	6	ΤΡ10	2
ΠΡ12	14	ΣΚ14	5	ΤΡ13	1
ΠΡ13	14	ΣΚ17	6	ΤΡ14	3
ΠΡ14	14	ΣΚ18	6	ΤΡ17	3
ΠΡ15	15	ΣΚ20	12	ΤΡ18	2
ΠΡ16	14	ΣΚ21	11	ΤΡ19	1
ΠΡ2	17	ΣΚ22	11	ΤΡ2	2
ΠΡ5	16	ΣΚ23	11	ΤΡ20	3
ΠΡ6	16	ΣΚ24	12	ΤΡ21	1
ΠΡ9	15	ΣΚ6	5	ΤΡ23	2
ΠΡ10	14	ΣΚ7	5	ΤΡ24	1
ΠΡ3	14	ΣΚ8	6	ΤΡ25	1
				ΤΡ27	3
				ΤΡ29	3
				ΤΡ3	4
				ΤΡ30	3
				ΤΡ31	1
				ΤΡ4	3
				ΤΡ9	2



**Εικόνα 3: Πρότυπα που προκύπτουν από SSCP ανάλυση του 2ου εξονίου του DAB.**

Στην εικόνα 3 παρουσιάζονται κάποια πρότυπα που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο του SSCP για το 2<sup>ο</sup> εξόνιο του γονιδίου DAB. Όπως και στο UAA, έτσι και εδώ τα πρότυπα δεν μοιράζονται τον ίδιο αριθμό αλληλομόρφων. Εμφανίζονται όμως πιο απλά σχετικά με τα πρότυπα του UAA. Δηλαδή, όπως διακρίνεται τα πρότυπα αποτελούνται το πολύ από 3 αλληλόμορφα. Επίσης, αρκετά πρότυπα εμφανίζουν κάποιες κοινές ζώνες, δηλαδή περιέχουν και κάποια κοινά αλληλόμορφα.

Αξίζει στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι παρόλο που τα πρότυπα για το 2<sup>ο</sup> εξόνιο του γονιδίου DAB είναι 22 στον αριθμό, αποτελούνται το πολύ από 3 αλληλόμορφα. Αντίθετα, τα πρότυπα για το για το 2<sup>ο</sup> εξόνιο του γονιδίου UAA είναι μόνο δώδεκα, αλλά ο αριθμός των αλληλομόρφων φαίνεται να είναι μεγαλύτερος του 3.

Για τον προσδιορισμό του ακριβούς αριθμού και της αλληλουχίας των αλληλομόρφων για καθένα από τα εξόνια που μελετήθηκαν έγινε μια προσπάθεια υποκλωνοποίησής τους. Τα προϊόντα της PCR συνδέθηκαν με πλασμίδιο με βάση την τεχνική του TA cloning και



ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *E.Coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Έπειτα, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA και αναλύθηκε με τη μέθοδο της PCR-SSCP. Αντίθετα με τα αναμενόμενα αποτελέσματα, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια έφεραν πάνω από ένα αλληλόμορφα σε κάθε κλώνο, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η περαιτέρω ανάλυση των αλληλομόρφων.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πέστροφα είναι από τα καλύτερα μελετημένα είδη των Salmonidae της Ευρώπης. Τα είδος αποτελείται από πολυάριθμες ξεχωριστές γεωγραφικές μορφές και εμφανίζει αξιοσημείωτη μεταβλητότητα και πλαστικότητα σε πολλά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την μορφολογία, την οικολογία και τη συμπεριφορά. Αυτή η μεταβλητότητα οδήγησε τους ερευνητές να αναγνωρίσουν αρχικά τουλάχιστον 50 είδη τα οποία σήμερα θεωρείται ότι ανήκουν σε ένα μόνο είδος, το *S. trutta* (Behnke 1986; Elliot 1989). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί εκτεταμένη ενδοπληθυσμιακή γενετική διαφοροποίηση σε αυτά τα είδη (Ferguson 1989). Η μοριακή ανάλυση αυτής της διαφοροποίησης σε φυσικούς πληθυσμούς μπορεί να παρέχει δεδομένα για τη δομή των πληθυσμών τα οποία όταν συνδυαστούν με πληροφορίες που αφορούν τη βιογεωγραφία μπορούν να προσδιορίσουν σημαντικά στοιχεία για τη δομή και τη δυναμική των πληθυσμών (Avisé 1994).

Οι πρώτες μελέτες της γενετικής δομής της πέστροφας βασίστηκαν σε ηλεκτροφορητικές αναλύσεις ισοενζύμων (Ferguson 1989; Guyomard 1989). Αθροιστικά, αυτές οι μελέτες έδειξαν την ιδιαιτερότητα των βορειο-δυτικών «Ατλαντικών» και των νοτιο-ανατολικών πληθυσμών (Apostolidis et al. 1996a). Ακολούθησαν αναλύσεις του μιτοχονδριακού DNA σε πληθυσμούς από πέστροφες διάφορων περιοχών, οι οποίες αποκάλυψαν την ύπαρξη 5 κύριων, γεωγραφικά διαχωρισμένων, φυλογενετικών ομάδων (Bernatchez et al. 1992; Giuffra et al. 1994; Bernatchez & Osinon 1995). Ωστόσο, αυτές οι μελέτες δεν επικεντρώθηκαν σε σχέσεις και προελεύσεις των πληθυσμών πέστροφας των νοτιών Βαλκανίων, και ιδιαίτερα για τους πληθυσμούς που ζουν σε λεκάνες του Ιονίου και του Αιγαίου. Σε αυτές τις περιοχές, πιστεύεται ότι υπάρχουν διάφορα ξεχωριστά υποείδη των οποίων η ταξινόμηση και η κατανομή παραμένουν αδιευκρίνιστα (Economidis 1991).

Οι πέστροφες της Ελλάδας ανήκουν σε δυο διαφορετικές ιχθυογεωγραφικές ζώνες: την νότια Ιόνια-Αδριατική, που περιλαμβάνει ποτάμια της δυτικής και νότιο-δυτικής Ελλάδας και Αλβανίας, και τη ζώνη Αιγαίου-Πόντου, η οποία περιλαμβάνει ποτάμια της βόρειας και βόριο-ανατολικής Ελλάδας (Economidis & Banarescu 1991).

Προηγούμενες αναλύσεις ισοενζυμικής ποικιλομορφίας ομαδοποίησαν τις πέστροφες του Ελλαδικού χώρου σε δυο διαφορετικές γενιές, που αντιστοιχούνε στην οριοθέτηση των δυο διαφορετικών ιχθυογεωγραφικών ζωνών (με εξαίρεση τον πληθυσμό της Πρέσπας που ομαδοποιήθηκε ξεχωριστά). Ωστόσο μια πιο πρόσφατη ανάλυση PCR-RFLP του πολυμορφισμού του μιτοχονδριακού DNA στους ίδιους πληθυσμούς αποκάλυψε την ύπαρξη 4 διαφορετικών φυλογενετικών ομάδων και έδειξε μικρή γεωγραφική δομή (Apostolidis et al. 1996b.) Ωστόσο, η ύπαρξη τριών τουλάχιστον γενιών σε μια περιορισμένη περιοχή όπως η Ελλάδα είναι εκπληκτικό και υποδηλώνει την αφθονία της γενετικής ποικιλίας η οποία υπάρχει στις πέστροφες των νοτίων Βαλκανίων.

Η ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA από πληθυσμούς *S. trutta* έδειξε ότι οι πληθυσμοί αυτοί είχαν ένα μοναδικό γενετικό προφίλ χωρίς να εμφανίζονται κοινοί γενότυποι με άλλους πληθυσμούς, ακόμα και με αυτούς που ανήκουν στην ίδια ομάδα. Αυτή η σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς μπορεί να υπάρχει λόγω της μεγάλης περιόδου απομόνωσης που συνδυάστηκε με φαινόμενα στενωπού και επακόλουθα φαινόμενα γενετικής παρέκκλισης. Σε τέτοιες περιπτώσεις, οι κοινοί γενότυποι mtDNA ανάμεσα στους πληθυσμούς μπορεί να έγιναν σπάνιοι ή να εξαφανίστηκαν μέσω τυχαίας απώλειας από γενιά σε γενιά. (Pamilo & Nei 1988). Ωστόσο, αυτό το φυλογεωγραφικό πρότυπο, στο οποίο εμφανίζεται μια ασυνέχεια στο φυλογενετικό δέντρο στο

mtDNA είναι ασυνήθιστο, και έχει αναφερθεί στο παρελθόν σε πολύ λίγα είδη. (Avisé 1994).

Η γενετική δομή, λοιπόν, των πληθυσμών πέστροφας της Ελλάδας έχει μελετηθεί τόσο με ανάλυση του mtDNA όσο και με ανάλυση ισοενζύμων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων εμφανίζονται συμφωνίες και ασυμφωνίες ανάμεσα στις δυο μεθόδους. Τα δεδομένα και από τις δυο μεθόδους υποδεικνύουν τη διαφοροποίηση των πληθυσμών του Ατλαντικού από τους Μεσογειακούς. Ο βαθμός αυτής της διχοτόμησης υποδηλώνεται επίσης και από τις τιμές της γενετικής απόστασης. Επίσης, και οι δύο μελέτες δείχνουν ότι η γενετική διαφοροποίηση είναι μεγαλύτερη διαπληθυσμιακά παρά ενδοπληθυσμιακά. Επιπλέον, συνηγορούν στο ότι ο πληθυσμός της Οχρίδας (*S.t. letnica*) είναι ένα ξεχωριστό υποείδος που προήλθε από ένα κοινό πρόγονο, αλλά ο διαχωρισμός είναι αρκετά πρόσφατος.

Αντιθέτως, ασυμφωνίες μεταξύ των μεθόδων παρατηρήθηκαν στην έκταση της ενδοπληθυσμιακής και διαπληθυσμιακής γενετικής διαφοροποίησης. Η απουσία ταύτισης μεταξύ δεδομένων φυλογένεσης βασισμένης σε μιτοχονδριακό και πυρηνικό DNA μπορεί να είναι αποτέλεσμα του διαφορετικού τρόπου κληρονομησης και εξέλιξης των δυο αυτών γενετικών συστημάτων. Τέτοιες ασυμφωνίες μεταξύ των μεθόδων έχουν αναφερθεί και στη βιβλιογραφία (e.g. Bernatchez et al. 1992; Hansen 1994; Bernatchez & Osinon 1995).

Οι δύο ζώνες που διακρίνονται στην ομαδοποίηση των πληθυσμών της πέστροφας είναι η ζώνη Αιγαίου-Πόντου, στην οποία ανήκουν τα ποτάμια Νέστος, Τριπόταμος και Βενέτικος, και Ιόνια-Αδριατική ζώνη. Οι πληθυσμοί με τη σειρά τους ομαδοποιούνται σε τρία ξεχωριστά γκρουπ:

1. Πληθυσμοί των Αχελώου, Μόρνου, Νέστου
2. Πληθυσμοί των Αλφειού, Αγίου Γερμανού, Έβινου, Θιαμούς, Τριπόταμου και Οχρίδας

### 3. Πληθυσμοί του Βοϊδομάτη

Η παρούσα μελέτη είχε ως αντικείμενο την ανάλυση των πολυμορφισμών σε γονίδια MHC από αντιπροσωπευτικά άτομα πληθυσμών του είδους *S. trutta*. Συγκεκριμένα, ερευνήθηκε η ποικιλότητα του 2<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου UAA (τάξης I) και του 2<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου DAB (τάξης II). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου PCR-SSCP. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζεται μεγάλη διαφοροποίηση τόσο ενδοπληθυσμιακή όσο και διαπληθυσμιακή, η οποία υπερτερεί έναντι της πρώτης. Τα δεδομένα αυτά είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις που περιγράφηκαν παραπάνω.

Για το 2<sup>ο</sup> εξόνιο του γονιδίου UAA αποκαλύφθηκαν 12 πρότυπα, τα οποία εμφανίζονται στους πληθυσμούς. Ένα μόνο από τα πρότυπα αυτά απαντάται σε άτομα από δύο πληθυσμούς ταυτόχρονα (Άραχθος – Βοϊδομάτης). Στην περίπτωση του 2<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου DAB αποκαλύφθηκαν 22 πρότυπα. Δύο από τα πρότυπα αυτά εμφανίζονται κοινά σε πάνω από ένα πληθυσμό (Αχελώος – Βοϊδομάτης & Άραχθος – Σκοπός). Τα πρότυπα και η κατανομή τους δε μπορούν να δώσουν συγκεκριμένες πληροφορίες για τη γενετική δομή των πληθυσμών που αναλύθηκαν. Αποτελούν μια πρώτη ένδειξη της πιθανής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών αυτών.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των γονιδίων MHC δεν είναι απολύτως σύμφωνα με τις προηγούμενες αναλύσεις με βάση πυρηνικούς και μιτοχονδριακούς γενετικούς τόπους. Συγκεκριμένα, η ομαδοποίηση που θα μπορούσε να προταθεί με βάση την ανάλυση των MHC διαφέρει από τον προτεινόμενο διαχωρισμό σε δύο ζώνες και τρεις ομάδες πληθυσμών. Το γεγονός αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί με βάση το ότι η ανάλυση PCR-SSCP δε δίνει ακριβή αποτελέσματα με τα οποία μπορεί να δομηθεί η φυλογενετική συσχέτιση μεταξύ των υπό μελέτη πληθυσμών.

Επιπλέον, οι γενετικοί τόποι του MHC είναι περισσότερο πολυμορφικοί λόγω της φύσης της λειτουργίας των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν. Οπότε, ίσως η ανάλυση ενός και μόνο εξονίου να μην επαρκεί για την ανάλυση φυλογενετικών σχέσεων. Θα πρέπει ακόμα να αναφερθεί ότι δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί πλήρως αν κάποιο πρότυπο αποτελούσε το συνδυασμό δύο άλλων, γεγονός που ίσως να έκανε πολύπλοκη την εξαγωγή συμπερασμάτων. Η τετραπλοειδής καταγωγή των Salmonidae και το γεγονός ότι ένα σημαντικό ποσοστό των γονιδιακών τόπων παραμένει διπλασιασμένο (Allendorf 1978) δυσχεραίνει την ερμηνεία των ηλεκτροφορητικών προτύπων.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι ο γονιδιακός τόπος UAA που ανήκει στην τάξη I περιλαμβάνεται στα μη κλασικά γονίδια MHC. Σύμφωνα λοιπόν με τα υπάρχοντα δεδομένα, θα αναμενόταν ο γενετικός αυτός τόπος να μην είναι πολυμορφικός. Παρόλα αυτά στην παρούσα μελέτη αποκαλύφθηκαν 12 πρότυπα – συνδυασμοί αλληλομόρφων για το 2<sup>ο</sup> εξόνιο του UAA. Στην περίπτωση του γονιδιακού τόπου DAB, που ανήκει στην τάξη II, ο πολυμορφισμός που παρατηρήθηκε ήταν στα αναμενόμενα επίπεδα. Το 2<sup>ο</sup> εξόνιο του γονιδίου, το οποίο και μελετήθηκε, κωδικοποιεί για την περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου (PBR), στην οποία απαντάται η πληθώρα των πολυμορφισμών των μορίων αυτών.

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα είδη των ψαριών του γλυκού νερού διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζουν πολύ υψηλότερο ποσοστό γενετικού πολυμορφισμού από τα θαλάσσια είδη (Gyllensten 1985). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί με το παρακάτω σκεπτικό. Η σημαντική γεωγραφική απομόνωση που παρουσιάζουν μεταξύ τους οι πληθυσμοί των ψαριών του γλυκού νερού έχει ως αποτέλεσμα ο κάθε πληθυσμός να συσσωρεύει σημαντικές γενετικές αλλαγές. Κατόπιν η δράση της φυσικής επιλογής διαφοροποιεί ακόμα περισσότερο αυτούς τους πληθυσμούς. Στη

διαφοροποίηση αυτή συμβάλλουν όμως και τυχαίοι παράγοντες όπως είναι η γενετική παρέκκλιση, τα φαινόμενα που σχετίζονται με την αρχή του ιδρυτή και οι μεταλλάξεις.

Παραπάνω περιγράφηκαν όλες οι αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί για τη διερεύνηση της γενετικής δομής της πέστροφας. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για τη φυλογενετική ανάλυση των πληθυσμών *S. trutta*. Ωστόσο, αποτελούν μια πρώτη ένδειξη της ποικιλότητας τους. Η περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων και η ανάλυση των προτύπων σε επίπεδο αλληλομόρφων και αλληλουχιών θα παρέχει μια εικόνα της ποικιλομορφίας και των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών πέστροφας (*S. trutta*) από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

**Aguadé, M.W., Meyers, A.D., Long, and Langley, C.H.** [1994] Reduced DNA sequence polymorphism in the *su(s)* and *su(w<sup>a</sup>)* regions of the *Drosophila melanogaster* as revealed by SSCP and stratified DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 4658-4662

**Allendorf, F.W.** (1978) Protein polymorphism and the rate of loss of duplicate gene expression. *Nature* 272:76-78

**Apostolidis, A., Triantaphyllidis, C., Kouvatsi, A. and Economidis, P.**, (1997), Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations *Molecular Ecology* 6, 531-542

**Apostolidis, A., Karakousis, Y., Triantaphyllidis, C.**, (1996b) Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek brown trout (*Salmo trutta* L.) populations as revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *Heredity*, 77, 608-18.

**Apostolidis A. , Karakousis Y., Triantaphyllidis C.** (1996a) Genetic divergence and phylogenetic relationships among brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Greece and other European countries. *Heredity*, 76, 551-560.

**Avise, J.C.**, (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York.

**Bachman, R.A.** (1991) Brown trout (*Salmo trutta*). Pages 208-229 in J. Stolz and J. Schnell, editors, *Trout*. Stackpole Books, Harrisburg, PA.

**Behnke, R.J.** (2002) *Trout and salmon of North America*. First edition. The Free Press, Simon and Schuster Inc., New York, NY. 360 pp.

**Behnke, R.J** (1986) Brown trout. *Trout*, 27, 42-47

**Bernatchez, L., Osinov, A.** (1995) Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology*, 4, 285-298.

**Bernatchez, L., Guyomard, R., Bonhomme, F.**, (1992) DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1, 161-173

Cardwell, T. N., Sheffer, R. J., and Hedrick, P. W. (2001) MHC Variation and Tissue Transplantation in Fish. *The American Genetic Association* 92:305–308

Consuegra, S., Megens, H. J., Leon, K., Stet, R. J. M. & Jordan, W. C. (2005). Patterns of variability at the major histocompatibility class II alpha locus in Atlantic salmon contrast with those at the class I locus. *Immunogenetics* 57, 16–24.

Dixon, B., Van Erp, S. H. M., Rodrigues, P. N., Egberts, E., and Stet, R. J. M (1995). Fish major histocompatibility complex genes: an expansion. *Dev Comp Immunol* 19: 109–133

Economidis, P.S., (1991) Check list of freshwater fishes of Greece. *Hellenic society for the protection of nature*, Athens (1991).

Economidis, P.S., Banarescu, P., (1991) The distribution and origins of freshwater fishes in the Balkan peninsula, especially in Greece. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, 76, 257–283

Edwards, S. and Hedrick, P. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection

Elliot, J., (1989) Wild brown trout *Salmo trutta*: an important national and international resource. *Freshwater Biology*, 21, 1–5

Fehlmann, M., Peyron, J.F, Samson, M., Van Obberghen, E., Brandenburg, D., and Brossette, N., (1985) Molecular association between major histocompatibility complex class I antigens and insulin receptors in mouse liver membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A*. December; 82(24): 8634–8637

Ferguson, A., (1989) Genetic differences among brown trout, *Salmo trutta*, stocks and their importance for the conservation and management of the species. *Freshwater Biology*, 21, 35–46

Flajnik, M.F., Canel, C., Kramer, J., Kasahara, M., (1991) Evolution of the major histocompatibility complex: molecular cloning of major histocompatibility complex class I from the amphibian *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 537– 541

Giuffra, E., Bernatchez, L., Guyomard, R., (1994) Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from Northern Italy. *Molecular Ecology*, 3, 161–172

Grimholt, U., Stig, L., Rolf, N., Midtlyng, P., Kjoeglum, S., Storset, A., Saebø S., Stet, R.J.M (2003) MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci *Immunogenetics* 55:210–219

Grimholt, U., Drablos, F., Jorgensen, S. M., Hoyheim, B. & Stet, R. J. M. (2002). The major histocompatibility class I locus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): polymorphism, linkage analysis and protein modelling. *Immunogenetics* 54, 570–581

Grimholt U, Drabløs F, Jorgensen SM, Høyheim B, Stet RJM (2002) The Major histocompatibility class I locus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): polymorphism, linkage and protein modelling. *Immunogenetics* 54:570–581

Guyomard, R., (1989) Diversité génétique de la truite commune. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 314, 118–135.

Gyllensten, U., (1985) The genetic structure of fish : differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. *J.Fish Biol.* 26: 691-699

Hansen, M., (1994) *Genetic differentiation among Danish brown trout (Salmo trutta L.) populations and interactions between wild and hatchery-reared trout*. PhD thesis, University of Aarhus.

Hess, C.M., Gasper, J., Hoekstra, H.E., Hill C.E., Edwards, S.V., (2000) MHC class II pseudogene and genomic signature of a 32-kb cosmid in the house finch (*Carpodacus mexicanus*). *Genome Research*, 10, 613–623.

Hughes, A.L. and Nei, M., (1988) Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection, *Nature* 335, 167–170

Hughes, A.L. and Nei, M., (1989) Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86, 958–962

Hughes, A.L, Nei, M., (1993): Evolutionary relationships of the classes of major histocompatibility complex genes. *Immunogenetics* 37:337

- Kasahara, M., Nakaya, J., Satta, Y., Takahata, N.,** (1997): Chromosomal duplication and the emergence of the adaptive immune system. *Trends in Genetics* 13:90
- Kasahara, M.** (1997) New insights into the genomic organization and origin of the major histocompatibility complex: role of chromosomal (genome) duplication in the emergence of the adaptive immune system, *Hereditas* 127, 59–65
- Kasahara, M., Hayashi, M., Tanaka, K., Inoko, H., Sugaya, K., Ikemura, T., Ishibashi, T.** (1996): Chromosomal localization of the proteasome Z subunit gene reveals an ancient chromosomal duplication involving the major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:9096
- Kasahara, M., Vazquez, M., Sato, K., McKinney, E. C., and Flajnik, M.** (1992) Evolution of the major histocompatibility complex: isolation of class II A cDNA clones from the cartilaginous fish. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6688 – 6692
- Kaufman, J., S. Milne, T. W. F. Gobel, B. A. Walker, J. P. Jacob, C. Auffray, R. Zoorob, and S. Beck.** (1999). The chicken B locus in a minimal essential MHC. *Nature* 401:923–925
- Klein, J.** (1986). *Natural History of the Major Histocompatibility Complex.* New York: John Wiley
- Klein, J., O’hUigin, C.** (1994) MHC polymorphism and parasites. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 346, 351–358
- Lauder GV, Leim KF** (1983) The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *Bull Mus Comp Zool* 150:95–197
- Matsunaga, T., Rahman, A.** (1998): What brought the adaptive immune system to vertebrates? *Immunological Reviews* 166:177
- McConnell, T., Godwin, U. B., Norton, S. F., Nairn, R. S., Kazianis, S., and Morizot, D. C.,** (August 1998) Identification and Mapping of Two Divergent, Unlinked Major Histocompatibility Complex Class II B Genes in Xiphophorus Fishes *Genetics* 149: 1921–1934

Messaoudi, I., Guevara, P. J., Dyall, R., LeMaout, J., Nikolich-Zugich, J., (NOVEMBER 2002) Direct Link Between *mhc* Polymorphism, T Cell Avidity, and Diversity in Immune Defense SCIENCE VOL 298 29

Miller, K.M, Withler, R.E (1998) The salmonid class I MHC: limited diversity in a primitive teleost. *Immunol Rev* 166:279–293

Miller, K. M., Withler, R. E., and Beacham, T. D. (1997). Molecular evolution at MHC genes in two populations of chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Mol. Ecol.* 6:937.

Mitchum, D.L. (1982). Game and Fish Research: Diagnosis of Diseases in Fish/Survey of Salmonid Populations in Wyoming for Bacterial Kidney Disease, Furunculosis, and Enteric Redmouth. Wyoming Game and Fish Department. 28 pages

Moyle, P.B. and J.J. Cech, Jr. (2000). Fishes: An introduction to ichthyology. Fourth edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 612 pp

Nonaka, M., Matsuo, M., Naruse, K. & Shima, A. (2001). Comparative genomics of medaka: the major histocompatibility complex (MHC). *Marine Biotechnology* 3, S141–S144.

Nonaka, M., Namikawa, C., Kato, Y., Sasaki, M., Salter, L. & Flajnik, M. F. (1997). Major histocompatibility complex gene mapping in the amphibian *Xenopus* implies a primordial organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5789–5791

Ohno, (1970) *S. Evolution by Gene Duplication*, Springer, New York

Okamura, K., Ototake, M., Nakanishi, T., Kurosawa, Y., and Hashimoto, K. (1997.) The most primitive vertebrates with jaws possess highly polymorphic MHC class I genes comparable to those of humans. *Immunity* 7:777.

Olsen, K.H, Grahn, M., Lohm, J., (2002). Influence of *mhc* on sibling discrimination in Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.). *J Chem Ecol* 28: 783–795.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, (1989) T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766 –2770

- Pamilo, P., Nei, M.** (1988) Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 568–583.
- Penn, D.J, Potts, W.K.** (1999) The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. *American Naturalist*, 153, 145–164
- Phillips, L., Moule, M., Delovitch, T., Yip, C.,** (May 1986) Class I histocompatibility antigens and insulin receptors: Evidence for interactions Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 83, pp. 3474-3478, Medical Sciences
- Rajakaruna, R.S, Brown, J.A, Kaukinen, K., Miller, K.M** (2001) MHC genes influence the kin recognition in juvenile Atlantic salmon. *American Zoologist*, 41, 1562–1562
- Rothbard, J.B, Geftter, M.L.** (1991) Interactions between immunogenetic peptides and Mhc proteins. *Annu Rev Immunol* 9, 527–565
- Sato, A., F. Figueroa, B. W. Murray, E. Malaga-Trillo, Z. Zaleska-Rutczynska, H. Sultmann, S. Toyosawa, C. Wedekind, N. Steck, and J. Klein.** (2000). Nonlinkage of major histocompatibility complex class I and class II loci in bony fishes. *Immunogenetics* 51: 108–116
- Sato, A., Figueroa, F., O’hUigin, C., Steck, N., Klein, J.** (1998) Cloning of major histocompatibility complex (Mhc) genes from threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 7:221–231
- Sato, A., Klein, D., Sultmann, H., Figueroa, F., O’hUigin, C., Klein, J.** (1997) Class I Mhc genes of cichlid fishes: identification, expression and polymorphism. *Immunogenetics* 46:63–72
- Schisler, G.J., P.G. Walker, L.A. Chittum, and E.P. Bergersen.** (1999). Gill ectoparasites of juvenile rainbow trout and brown trout in the Upper Colorado River. *Journal of Aquatic Animal Health* 11:170-174
- Schreiber, A., Schlessinger, J., and Edidin, M.,** (1984) Interaction between Major Histocompatibility Complex Antigens and Epidermal Growth Factor Receptors on Human Cells *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY " VOLUME 98 FEBRUARY 725-731*
- Shum, B.P, Guethlein, L., Flodin, L.R, Adkison, M.A., Hedrick, R.P., Nehring, R.B., Stet, R.J.M., Secombes, C., Parham, P.,** (2001) Modes of salmonid MHC class I and II evolution differ from the primate paradigm. *J. Immunol.*, 66, 3297–3308.



**Simpson, J.C. and Wallace, R.L.** (1982). *Fishes of Idaho*. University of Idaho Press, Moscow, ID. 238 pp.

**Stet, R. J. M., de Vries, B., Mudde, K., Hermsen, T., van Heerwaarden, J., Shum, B. P. & Grimholt, U.** (2002). Unique haplotypes of co-segregating major histocompatibility class II A and class II B alleles in Atlantic salmon (*Salmo salar*) give rise to diverse class II genotypes. *Immunogenetics* 54, 320–331

**Strange, R.J.** (1996). Field examination of fishes. Pages 433-446 *in* B.R. Murphy and D.W. Willis, editors. *Fisheries techniques*. Second edition. American Fisheries Society, Bethesda, MD.

**Sweetman, W. A., Rash, R., Sykes, B., Beighton, P., Hecht, J. T., Zabel, B., Thomas, J. T., Boot-Handford, R., Grant, M. E., and Wallis, G. A.** (1992). SSCP and segregation analysis of the human type X collagen gene (COL10A1) in heritable forms of chondrodysplasia. *American Journal of Human Genetics* 51:841-849

**Takahata, N. & Nei, M.** (1990). Allelic genealogy under overdominant and frequency dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* 124, 967–978.



